



Departamento de Bioquímica

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
MUTACIONES EN LOS GENOMAS
MITOCONDRIAL Y NUCLEAR EN MUESTRAS DE
PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍAS
FAMILIARES

Tesis Doctoral

Pedro Félix Villar Espejo

Madrid 2015

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENOMAS
MITOCONDRIAL Y NUCLEAR EN MUESTRAS DE PACIENTES CON
MIOCARDIOPATÍAS FAMILIARES**

Memoria presentada por el Licenciado en Biología

Pedro Félix Villar Espejo

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

Belén Bornstein Sánchez

Juan José Arredondo Lamas

Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro
Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC-UAM

Facultad de Medicina Departamento
de Bioquímica Universidad Autónoma
de Madrid

Instituto de Investigación Sanitaria
Puerta de Hierro Majadahonda

Dra. Belén Bonstein Sánchez, F.E.A. de Bioquímica Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Majadahonda y Juan José Arredondo Lamas, P.C.D. del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, como Directores de Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que Don Pedro Félix Villar Espejo con DNI 50115797Q, licenciado en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección, en el Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Majadahonda y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", el trabajo titulado:

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENOMAS MITOCONDRIAL Y NUCLEAR EN MUESTRAS DE PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍAS FAMILIARES.

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 1 de junio de 2015

Belén Bornstein Sánchez

Juan José Arredondo Lamas

Directora de Tesis Doctoral

Director de Tesis Doctoral

C/ Arzobispo Morcillo S/N 28029 Madrid

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un Proyecto de la SEC para Investigación Básica en Cardiología 2010 por parte de la Sociedad Española de Cardiología a los doctores Luis Alonso-Pulpón Rivera, Pablo García Pavía, Juan Arredondo Lamas, Belén Bornstein Sánchez y Margarita Cervera Jover; y gracias a la concesión de un Contrato de Formación de Personal Investigador 2011 por parte de la Fundación Para la Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda a Pedro Félix Villar Espejo.

A mis padres.

Agradecimientos

Tras todo el tiempo vivido en el laboratorio he pasado por muchas cosas. Algunas eran buenas y otras malas. En todo este proceso he conocido a mucha gente que ahora forma parte de mi vida. He llegado a adquirir una buena formación y he aprendido muchas cosas que, estoy seguro, me servirán en mi vida, tanto en el ámbito científico como en cualquier otro. He pasado por momentos difíciles y muy duros, encerrado en el laboratorio con experimentos que no salían, mientras fuera del laboratorio se pasa la vida. En todos estos momentos he tenido a gente a mi lado que me ha apoyado, que me ha enseñado y que ha hecho posible que pueda llegar hasta aquí. Por eso os doy las gracias a todos.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Belén Bornstein y al Dr. Juan Arredondo el haber depositado la confianza en mí para poder llevar a cabo este proyecto. Muchas gracias por lo que me habéis enseñado, por haberme apoyado y por haber buscado soluciones conmigo a los problemas que surgían. También quiero dar las gracias a la Dra. Margarita Cervera y al Dr. Rafael Garesse por haberme apoyado y haberme dado la oportunidad de participar en otros proyectos, que me han ayudado a formarme más.

Quiero dar las gracias a toda la gente que ha pasado por el laboratorio B20, porque me han ayudado de una u otra manera. En especial a Begoña, tú que me has ayudado tanto, hemos estado trabajando codo con codo y sin ti esto hubiera sido mucho más difícil. Gracias por todo lo que me has enseñado y por tu apoyo en los momentos más difíciles. Lidia, muchas gracias, por toda tu ayuda y por hacer tan fácil trabajar contigo, por haberme enseñado a quitarle el gastronemio al pobre "Skippy". Gracias a Lucía Guerrero por enseñarme a hacer WB y por esas risas al revelarlos. A Berta por estar tantas horas en el laboratorio conmigo, cuando ya sólo quedábamos los más pringados de cardio. Gracias por tu ayuda y por todas esas pizzas. A Leti por tu apoyo y tus consejos. Gracias por tus botas, pero no me quedaban bien. A Sara Temprano por ser tan comprensiva con esos mioblastos y no matarme. Gracias a David por haberme echado un cable y por animar el laboratorio. Gracias a Mari Cruz, Jorge, Laura, María, Alejandro, Vero, Pilar, Diego y a las últimas incorporaciones, Andrea, Sara Laine, Roberto, Sandra y Yolanda. Gracias a todos por vuestros consejos y por esos momentos juntos. Gracias a Aitor Delmiro, Pilar, Inés García Consuegra, Alberto Blazquez, Teresa García Silva y Miguel Ángel Martín del 12 de octubre y a Pablo García Pavía, Manuel Gómez y Luis Pulpón del Puerta de Hierro que han colaborado con nosotros para poder sacar adelante este proyecto.

También quiero dar las gracias a la gente del B19. Gracias a Alberto, a Ramiro y a Sara Palacios por todas las técnicas que me habéis enseñado, por toda vuestra ayuda, por esos ratos en cultivos y esos otros en la Yoli. Gracias por esas risas. Alberto, gracias por tus dibujos artísticos sobre mis apuntes y esquemas, que me hacían reír. Ramiro, muchas gracias por ofrecerte siempre a echar una mano, eres grande. Sara, gracias por estar pendiente cuando hace falta. Cristina y Mercedes, muchas gracias por enseñarme a dar mis primeros pasos con células. Esther, muchas gracias por todo lo que me has enseñado, que se dice pronto, por tus motes, tu biclip y tu sentido del humor, gracias a ti tengo el cerebro más tuneado. Gracias Teresa por esos momentos y esas bromas que le quitaban hierro a todo. Rosana,

muchas gracias por toda tu amabilidad y tu ayuda con los northern. Fran, gracias por esos consejos sobre anticuerpos magnéticos y por esas charlas frikis. Miguel, muchas gracias por enseñarme meticulosamente a utilizar radioisótopos, por todos tus consejos y explicaciones, por esas veces que me has ayudado de las que tal vez ni te acuerdes, pero yo sí. Gracias Paula, por enseñarme a hacer Blue Native. Gracias a Lucía Echevarría, a Carmen, a Maca y a todos los que han pasado por el B19 por su compañerismo.

Gracias a la gente del Departamento de Bioquímica por esas barbacoas y por esos ratos en cultivos con la gente del B15 y B16. A Marcos, por tus consejos, tu comprensión y por esas birras en la Yoli. A Lourdes por esas risas, cariño y apoyo. A Teresa por sus ánimos y esas palmeras de chocolate. A Madalina por su sentido del humor. A Néstor por esos truquillos de cuantitativas. Antonio y Raúl, me alegro muchísimo de que esta etapa de investigación ha hecho posible que pueda conoceros. Gracias maese Raúl por darme buenos consejos, por todas esas risas, porque se puede hablar contigo de todo y eres de fiar. Eres un genio, independientemente de a dónde llegues. Fuerza y honor. Antonio, gracias por toda tu ayuda, por tus consejos, por tu apoyo, por esas birras en la Yoli y esos gin tonic con Sara; del laboratorio a la pradera. Eres de las mejores personas que conozco. Gracias a Belén, Begoña y Alberto del Puerta de Hierro. A Diana y Conchi de Genómica del IIB, a Raquel y Teresa del SPR del IIB, a Diego y a Lucía de microscopía del IIB, a Ana y Lola del confocal de la UAM y a Laura de citometría de la UAM, muchísimas gracias por toda vuestra ayuda para realizar este proyecto.

No puedo olvidarme de mis compañeros de Biología. En especial agradezco a Natalia el estar siempre apoyándome en todo, incondicionalmente, y haberme puesto en contacto indirectamente con mis directores de Tesis Doctoral. Gracias a ti, elegí este camino y he llegado hasta aquí. A Paula, Guille, Fer Meizoso, Irene, Iker, Sandra, Zule, David, Clara, Aida, Isra, Fer Rodríguez, Elisa, Borja, Gema, Muriel, Noe, Eva y Fonsi. Con vosotros comencé esta aventura, gracias a todos por todo vuestro apoyo.

Gracias también a mis compañeros del Máster. Gracias a Ricardo por la ayuda para purificar cardiomiocitos y todos tus consejos. A Olga esa receta que tetaniza cardiomiocitos. A Fede, Blanca, Alfonso, Morgui, C. Ernesto, Pedro, Rocío, Patri, Jose Luis, y a todos los que me faltan por todos los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis amigos de siempre José Carlos, Juan, Alex, David, Daniel, Ángel Álamo, Enrique y Ángel Calvo por haber estado siempre ahí, por haberme comprendido cuando estaba siempre en el laboratorio y por haberme apoyado para realizar la Tesis Doctoral.

Gracias a toda mi familia, mis tíos, mis primos y mi abuela Anastasia, que me habéis apoyado incondicionalmente y me habéis animado a seguir adelante. A mis hermanas por toda la ayuda que he recibido desde siempre, en mis estudios y en todo lo que hiciera falta, para poder llegar hasta aquí.

Y por último, quiero darles las gracias a mis padres. Gracias por todo lo que habéis sacrificado para que yo haya podido estudiar una carrera, investigar y realizar esta Tesis Doctoral. Gracias por apoyarme y animarme. Gracias por intentar comprenderme cuando pasaba tanto tiempo en el laboratorio. Gracias por ponérmelo todo fácil.

Muchas gracias a todos.

Resumen/Summary

Las enfermedades mitocondriales comprenden un conjunto de patologías resultado de la disfunción del sistema de fosforilación oxidativa. Cada año, tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear, se describen nuevas mutaciones a la vez que se identifican nuevos genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades. En pacientes con enfermedad mitocondrial, la predominancia de manifestaciones neuromusculares puede llegar a enmascarar la presencia de otros fenotipos clínicos como las miocardiopatías. Por tanto, la caracterización de las miocardiopatías con un origen mitocondrial es incompleta, siendo necesario comprender los mecanismos patogénicos implicados en su desarrollo. Por otro lado, se han descrito una gran cantidad de mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas implicados en el desarrollo de miocardiopatías. Es de interés general avanzar en la identificación y caracterización de nuevas mutaciones, tanto en genes mitocondriales como sarcoméricos, para comprender los distintos mecanismos patogénicos que subyacen a estas enfermedades. Previamente, nuestro grupo describió la mutación p.Gly128Cys en la proteína MYL3 en un paciente con miocardiopatía hipertrófica. Para determinar si esta mutación está implicada en el desarrollo de la enfermedad sería necesario realizar un estudio funcional. El coste de realizar un este tipo de análisis de nuevas mutaciones en modelos animales es muy elevado. Esto hace que sea necesario desarrollar un nuevo método de evaluación funcional.

Aquí se plasma el resultado de un estudio retrospectivo, cuyo objetivo fue caracterizar clínica y molecularmente una cohorte de pacientes con miocardiopatía y enfermedad mitocondrial. Además, se propone la utilización de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias de ratón, con el objetivo de evaluar la patogenicidad de nuevas mutaciones en genes sarcoméricos.

Se revisaron historias clínicas de 2520 pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial. Únicamente, evidenciamos una disfunción cardíaca acompañante en 127 pacientes. El criterio clínico de inclusión en este estudio fue la presencia de una perturbación cardíaca acompañada por una disfunción mitocondrial. Sólo 71 pacientes cumplieron este criterio. De estos, sólo se pudo secuenciar el genoma mitocondrial (ADNmt) en 45 pacientes, entre los que se encontraron nueve variantes nucleotídicas distintas. Se analizó la patogenicidad de 3 de los cambios encontrados mediante el uso de cíbridos transmitocondriales. Además, se identificaron 3 cambios nucleotídicos en el ADNmt potencialmente relevantes en el desarrollo de la enfermedad y 3 cuya patogenicidad ya había sido confirmada. No se encontraron mutaciones en ninguno de los 13 genes nucleares analizados. En cuanto al ensayo funcional en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias, se analizaron mutaciones previamente descritas en la proteína sarcomérica MYL3 sin que se hayan obtenido resultados concluyentes.

En conclusión, los ensayos funcionales siguen siendo necesarios para clasificar las distintas variantes en genes mitocondriales y sarcoméricos como patogénicas o polimórficas y poder explicar las características moleculares aún no caracterizadas de las miocardiopatías de origen familiar.

Mitochondrial diseases are multisystemic disorders, which have arisen as result of oxidative phosphorylation system dysfunctions. New mutations in the mitochondrial and nuclear genomes are being described each year while new genes involved in the development of these diseases are identified. In patients with mitochondrial diseases, the predominance of neuromuscular manifestations could mask the presence of other clinical phenotypes such as cardiomyopathies. Hence, the characterization of cardiomyopathies with mitochondrial origin is incomplete. It is therefore necessary to understand the pathogenic mechanism involved in their development. On the other hand, a large number of mutations in genes that codify for sarcomeric proteins involved in the cardiomyopathy development have been reported. It is in public interest to make progress in the identification and characterization of new mutations in mitochondrial and sarcomeric genes to understand the different pathogenic mechanisms that cause these diseases. The p.Gly128Cys mutation in the MYL3 protein gene was identified by our group, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. It should be desirable to develop a functional assay to establish this mutation involvement in the disease. Given the very high cost of performing a functional assay in animal models, it should be developed a new functional evaluation method.

We report a retrospective study which main objective was characterizing the clinical and molecular features of cardiomyopathy and mitochondrial disease in a cohort of patients. An additional aim is to develop a new method to evaluate the pathogenicity of mutations in sarcomeric genes.

Clinical histories from 2,520 patients, which had been evaluated for presumed mitochondrial diseases were reviewed. Accompanying cardiac dysfunction was observed in only 127 patients. The clinical criterion for their inclusion in this study was the presence of a cardiac disturbance accompanied by mitochondrial dysfunction. 71 patients met this criterion. The mitochondrial genome (mtDNA) from 45 patients was sequenced. Nine different nucleotide variants were found. The pathogenicity of 3 of them was investigated using transmitochondrial cybrids. Besides, three other nucleotide changes in mtDNA may be relevant related to disease development and while the last 3 had a previously confirmed pathogenicity. No mutations were found in the 13 nuclear genes analyzed. The trial to set up an embryonic stem cell-derived cardiomyocytes based functional assay did not show conclusive results for the mutations in the gene of MYL3 sarcomeric protein gene describe above.

In conclusion, additional research should be made in order to classify mitochondrial variants as pathogenic or polymorphic and to identify nuclear genes that could explain molecular features of familiar cardiomyopathies uncharacterized to date.

Índice

Índice

Clave de abreviaturas.....	31
Introducción	37
1. Origen de la mitocondria.....	39
1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en células y tejidos.....	40
1.2. Función mitocondrial	41
2. Estructura y metabolismo del ADN mitocondrial.	42
2.1. Genoma mitocondrial.	42
2.2. Replicación del ADNmt.....	44
2.3. Transcripción del ADNmt	45
2.4. Traducción del ADNmt.	45
3. Enfermedades mitocondriales.	46
3.1. Mutaciones en el ADNmt.	47
3.2. Mutaciones en el ADN nuclear.....	50
3.3. Mitocondria y Miocardiopatías.	52
3.4. Modelos animales y celulares en el estudio de enfermedades mitocondriales y miocardiopatías hipertróficas familiares.....	57
Objetivos	59
Materiales y Métodos	63
1. Materiales	65
1.1. Reactivos, soluciones y tampones.....	65
1.2. Líneas celulares.	65
1.3. Cepas bacterianas.	65
1.4. Vectores.	65
1.5. Radioisótopos.....	66
1.6. Oligonucleótidos.	66
1.7. Reactivos empleados en inmunocitoquímica y Blue Native.	74
2. Pacientes.	74
2.1. Análisis retrospectivo.	74
2.2. Muestras biopsiadas.	75
3. Métodos.	75
3.1. Análisis genético y determinación de haplogrupo.	75

3.2. Amplificación y secuenciación de 13 genes nucleares implicados en la función mitocondrial y asociados a MCM.....	76
3.3. Generación de cíbridos transmitocondriales y cultivo celular.....	76
3.4. Cuantificación de niveles de ADNmt en cíbridos transmitocondriales por RT-qPCR.....	78
3.5. Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNmt en clones celulares transmitocondriales.....	78
3.6. Espectrofotometría de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria (CR) mitocondrial en clones celulares transmitocondriales.....	78
3.7. Electroforesis Blue native en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	79
3.8. Curvas de crecimiento realizadas en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	80
3.9. Cuantificación de ATP en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	80
3.10. Medida del consumo de O ₂ por respirometría en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	81
3.11. Cuantificación del ARNt mitocondrial mediante northern blot.....	82
3.12. Cuantificación de ROS por citometría en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	82
3.13. Cuantificación del nº de células, tras inducción de apoptosis y mediante citometría, en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	83
3.14. Cuantificación de lactato en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.....	84
3.15. Diseño y construcciones plasmídicas.....	84
3.16. Establecimiento de líneas celulares ES y mantenimiento en cultivo celulares.....	86
3.17. Diferenciación de células ES a cardiomiocitos, disgregación de cuerpos embrioides (EBs) y cultivo de cardiomiocitos.....	87
3.18. Análisis de la estructura del sarcómero cardíaco por inmunocitoquímica.....	88
3.19. Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm en cardiomiocitos.....	88
Resultados.....	91
1. Evaluación retrospectiva de las historias clínicas de los pacientes con fenotipo clínico MCM-plus.....	93
1.1. Cuadro clínico.....	93
1.2. Análisis histológico y bioquímico en biopsias de músculo esquelético.....	94
2. Análisis molecular en material genético extraído de las biopsias musculares.....	95

2.1.	Secuenciación del genoma mitocondrial.	95
2.2.	Secuenciación de genes nucleares.....	97
3.	Generación de cíbridos transmitocondriales.	97
3.1.	Caracterización bioquímica y molecular de los cíbridos transmitocondriales generados para las variantes nucleotídicas encontradas en genes codificantes de subunidades estructurales del complejo IV.	98
3.2.	Evaluación funcional de la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen <i>MT-TV</i> encontrada en el paciente CM48.	102
4.	Generación de líneas celulares ES.....	110
4.1.	Análisis de los niveles de expresión de mCherry dirigida por los promotores de <i>Tnni3</i> y <i>MyI3</i> por microscopía confocal.	111
4.2.	Análisis de los niveles de expresión de ARN por qPCR.....	112
4.3.	Análisis de la estructura del sarcómero.	113
	Discusión	117
1.	Mutaciones en el ADNmt pueden generar un fenotipo de MCM.....	119
1.1.	Mutación patogénica m.3243A>G en el gen <i>MT-TL1</i> está asociada a MCM.....	120
1.2.	Las variantes nucleotídicas m.12923G>T en el gen <i>MT-ND5</i> y m.8519G>A en el gen <i>MT-ATP8</i> se han clasificado como posibles polimorfismos.....	120
1.3.	La variante nucleotídica m.9448A>G en el gen <i>MT-CO3</i> no produce defectos en el sistema OXPHOS de cíbridos transmitocondriales y se ha clasificado como un polimorfismo.	121
1.4.	La variante nucleotídica m.1291T>C en el gen <i>MT-RNR1</i> es una posible mutación patogénica.....	121
1.5.	La variante nucleotídica m.3721A>G <i>MT-ND1</i> es una posible mutación patogénica.....	122
1.6.	La mutación patogénica m.7896G>A genera un defecto en el ensamblaje y función del complejo IV en cíbridos transmitocondriales.	122
1.7.	Las variaciones de secuencia m.1644G>A y m.1628C>T en el gen <i>MT-TV</i> afectan de forma distinta a la función OXPHOS.....	123
1.8.	Los 13 genes mitocondriales analizados, codificados en el ADN nuclear, no presentan mutaciones n ninguno de los pacientes analizados.	124
2.	Evaluación de la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas.....	126
2.1.	Para desarrollar el ensayo funcional, se seleccionaron las células ES AMPIGX7 de ratón, que tienen capacidad para diferenciarse a cardiomiocitos.	127
2.2.	El fragmento de promotor del gen <i>MyI3</i> no dirige la expresión de proteínas en cardiomiocitos a diferencia el fragmento del promotor del gen <i>Tnni3</i>	127

2.3. Las mutaciones p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val en la proteína MYL3 no generan alteraciones detectables en la estructura del sarcómero.	128
2.4. No se observaron diferencias en la expresión de las distintas isoformas de MYL3, silvestre y con las mutaciones p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val.	128
2.5. Replanteamiento del abordaje experimental para la evaluación de la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas.....	130
Conclusiones	133
Bibliografía	137
Anexos	157

Clave de abreviaturas

ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
adPEO	Oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN transferente
BM	Biopsia muscular
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albumina de suero bovino
CI	Complejo I
CII	Complejo II
CIII	Complejo III
CitC	Citocromo C
CIV	Complejo IV
COX	Citocromo C oxidasa
CPEO	Oftalmoplejía externa progresiva crónica
CR	Cadena respiratoria
CRM	Cadena respiratoria mitocondrial
CS	Citrato sintasa
DCFH	2,7-Diclorofluoresceína diacetato
DCPIP	Diclorofenol-indofenol
DHODH	Dihidrorotato deshidrogenasa
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EBs	Cuerpos embrioides
ECG	Electrocardiograma
Eco	Ecocardiograma
EM	Enfermedad mitocondrial
FBS	Suero bovino fetal

FEVI	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FTE	Flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa
GAM	Anticuerpo de cabra anti-ratón
GFP	Proteína fluorescente verde
GMEM	Medio Glasgow modificado por Dulbecco
HSP	Promotor de la cadena pesada del ADN mitocondrial
HVI	Hipertrofia del ventrículo izquierdo
IF	Factor de iniciación de la traducción
IMDM	Medio Iscove modificado por Dulbecco
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
L-LDH	L-Lactato deshidrogenasa
LSP	Promotor de la cadena ligera del ADN mitocondrial
MAVD	Miocardopatía arritmogénica del ventrículo derecho
MCA	Miocardopatía arritmogénica
MCD	Miocardopatía dilatada
MCDI	Miocardopatía dilatada idiopática
MCH	Miocardopatía hipertrófica
MCM	Miocardopatía mitocondrial
MCR	Miocardopatía restrictiva
MELAS	Miopatía con encefalopatía
MERF	Epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas
MIF	Mitocondrias interfibrilares
MILS	Síndrome de Leigh heredado vía materna
MIMyCA	Miopatía y miocardopatía de herencia materna
MNGIE	Síndrome de encefalopatía mioneurogastrointestinal
MOGE(S)	Sistema de nomenclatura para clasificar las miocardopatías
MSS	Mitocondrias subsarcolémicas
NARP	Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa
NCVI	Miocardopatía no compactada del ventrículo izquierdo
OH	Origen de replicación de la cadena pesada del ADN mitocondrial
OL	Origen de replicación de la cadena ligera del ADN mitocondrial

ORF	Marco abierto de lectura
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEO	Oftalmoplejía externa progresiva
Pir-	deficiencia en síntesis de piruvato
Q	Ubiquinona
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RRF	Fibras rojas rasgadas
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SAM	Maquinaria de clasificación y ensamblaje
SDH	Succinato deshidrogenasa
SOD	Superóxido dismutasa
TIM	Translocasa de la membrana mitocondrial interna
TK-	Deficiencia del gen timidin kinasa
TOM	Translocasa de la membrana mitocondrial externa
Ur-	deficiencia en síntesis de uridina

Introducción

1. Origen de la mitocondria.

La teoría endosimbiótica postulada por F. Taylor y L. Margulis, sitúa el origen de la mitocondria en un fenómeno de endosimbiosis (Margulis, 1975), en el cual se originó un organismo, resultado de la unión entre una alfa-proteobacteria aerobia y un organismo huésped anaerobio, posiblemente una célula proeucariota. Según el modelo Ox-Tox, la proteobacteria aerobia evitaría los efectos tóxicos del oxígeno, mientras que el organismo huésped aportaría nutrientes a la proteobacteria (Kurland y Andersson, 2000). En el caso de la mitocondria, este evento de endosimbiosis ocurrió una única vez, y por tanto, se ha aceptado que las mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas tienen un origen común (Scheffler, 2001).

Algunos autores sitúan el paso de proteobacteria a endosimbionte en el momento en el que la proteobacteria adquirió la capacidad de intercambiar ADP y ATP con el citosol de la célula huésped, integrándose en el metabolismo celular (Kurland y Andersson, 2000). En un principio, la protomitocondria contenía en su genoma bacteriano todos los genes necesarios para la vida como organismo autónomo. Sin embargo, a lo largo de la evolución, gran parte de los genes se transfirieron al ADN nuclear (ADNn). En la actualidad, la mitocondria sigue manteniendo su propio genoma. El ADN mitocondrial (ADNmt) sólo retiene un reducido número de los genes del genoma original de la proteobacteria. En la mayoría de los animales el genoma mitocondrial codifica 37 genes, mientras que el resto de los aproximadamente 1500 genes del proteoma mitocondrial están codificados en el núcleo, son traducidos por ribosomas citoplásmicos y son transportados a la mitocondria a través de diversos sistemas de importe de proteínas (Wallace, 2005). Teniendo en cuenta que el genoma mitocondrial necesita coordinarse con el nuclear para su correcto funcionamiento (Garesse y Vallejo, 2001) se considera a la mitocondria como un orgánulo semiautónomo.

La mitocondria se encuentra presente en prácticamente todas las células eucariotas y en su interior tienen lugar un gran número de procesos metabólicos esenciales, que incluyen entre otros la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, y algunas etapas de la biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo. En particular, y debido a su importancia, se ha considerado que la función fundamental es la de generar energía química en forma de ATP mediante la combustión de los nutrientes obtenidos de la dieta, un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Esta visión metabólica es parcial y ha cambiado radicalmente en las últimas décadas al identificarse varios procesos celulares en los que la mitocondria desempeña un papel central, fundamentalmente la muerte celular programada (apoptosis) (Green, 2005), y la señalización intracelular mediada por calcio (Bianchi et al., 2004) y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Turrens, 2003).

1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en células y tejidos.

La actividad mitocondrial presenta una gran plasticidad que se traduce en las diferencias en la estructura, número y distribución de las mitocondrias en las distintas células de un organismo, de tal modo que existe una enorme diversidad estructural y funcional en relación a la demanda energética de los distintos tejidos.

La mitocondria posee una doble membrana que delimita dos compartimentos en su interior: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa, que separa el espacio intermembrana del citoplasma, es permeable a pequeñas moléculas e iones, mientras que la membrana mitocondrial interna es mucho menos permeable, necesitando de la presencia de transportadores específicos (Arco y Satrústegui, 2005). En la membrana mitocondrial interna se localiza la cadena de transporte electrónico y es, por tanto, el lugar físico donde se produce la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP mitocondrial.

En la doble membrana mitocondrial se localiza la maquinaria de importe de proteínas de la mitocondria. Dicha maquinaria está compuesta por una serie de complejos responsables del transporte y procesamiento de las proteínas de destino mitocondrial sintetizadas en el citoplasma. Prácticamente todas las proteínas mitocondriales de origen nuclear entran en la mitocondria a través de la translocasa de la membrana mitocondrial externa (TOM), para posteriormente y en función de su destino final pasar a la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM), responsable del procesamiento de las proteínas de la membrana externa, o a las translocasas de la membrana mitocondrial interna (TIM) (Wiedemann et al., 2004).

La membrana mitocondrial interna presenta invaginaciones lamelares, denominadas crestas, que incrementan la superficie de la misma y aumentan su capacidad funcional. Aunque la masa mitocondrial por célula es constante para cada tipo celular, la densidad de las crestas es variable, dependiendo principalmente de la demanda energética (Scheffler, 1999).

En los cardiomiocitos, se han descrito dos subpoblaciones mitocondriales, situadas, bien en racimos debajo del sarcolema (mitocondrias subsarcolémicas, MSS) o en hileras longitudinales dentro del aparato contráctil (mitocondrias interfibrilares, MIF). Las dos subpoblaciones mitocondriales difieren en morfología de crestas, con una estructura lameliforme en las MSS, mientras que hay una estructura tubular en las MIF. Además se han descrito niveles de oxidación de sustratos más elevados en las MIF y una mayor susceptibilidad al daño mitocondrial y a sobrecargas de calcio mediadas por liberación de citocromo c (Rosca y Hoppel, 2013).

Tradicionalmente se ha considerado a la mitocondria como un orgánulo discreto, de forma esférica o alargada, y con unas dimensiones que normalmente están en torno a 3-4 μm de largo y 1 μm de diámetro. Sin embargo, la morfología mitocondrial dista en numerosos casos de esta visión de la mitocondria como organelas individuales, acercándose más a un sistema reticular donde las mitocondrias

interaccionan entre sí mediante un proceso dinámico que implica eventos continuos de fusión y fisión mitocondrial (Chan, 2006). El proceso de fusión mitocondrial no sólo implica la fusión coordinada de las membranas externas e internas, sino también la mezcla de los contenidos de la matriz mitocondrial. En estos procesos están implicadas proteínas como las mitofusinas MFN1 y MFN2 y las dinaminas OPA1 en el caso de la fusión y DRP1 en el de la fisión (Chen y Chan, 2005). Así pues, la morfología mitocondrial es un parámetro altamente dinámico que puede ser regulado ajustando el balance entre los fenómenos de fusión y fisión mitocondrial, en función de las necesidades de la célula y que se ha demostrado esencial en el desarrollo en mamíferos (Detmer y Chan, 2007).

1.2. Función mitocondrial

Como se ha comentado previamente, la mitocondria es la principal productora de energía celular en forma de ATP. En ella tiene lugar el proceso de fosforilación oxidativa, mediante el cual las coenzimas reducidas $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , procedentes del catabolismo de nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico, y finalmente al O_2 . La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, realizada de forma secuencial a favor de potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de H^+ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico que se establece se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna. La energía generada por la disipación del gradiente de H^+ a través de la ATP-sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP. Esta reacción es reversible y la ATP-sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler, 1999).

El funcionamiento del sistema OXPHOS requiere la acción coordinada de una serie de complejos enzimáticos multiheteroméricos localizados en la membrana interna mitocondrial. Estos incluyen los complejos I, III y IV, responsables de la translocación de los protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, la ATP sintasa, o complejo V y una serie de complejos accesorios que suministran electrones a la coenzima Q (ubiquinona) que incluyen el complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), la flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa y la dihidroorotato deshidrogenasa. Además, interviene el citocromo c, una proteína periférica que actúa como transportadora de electrones entre los complejos III y IV (J. A. Smeitink et al., 2006) (Figura 1).

Algunos procesos de transporte en la membrana mitocondrial son dependientes de gradiente electroquímico generado por el sistema OXPHOS, e incluyen el transporte, no sólo de metabolitos, sino también de iones inorgánicos como fosfato, sodio, potasio o calcio.

El sistema OXPHOS también juega un papel crucial en el mantenimiento de los balances (equilibrios) redox, ácido-base y metabólico de la célula, y por extensión en los compartimentos extracelulares (J. A.

Smeitink et al., 2006). Además, el potencial electroquímico generado por el sistema OXPHOS está implicado en el proceso de termogénesis que tiene lugar en el tejido adiposo marrón. Mediante la acción de la proteína desacoplante 1 (UCP1), la energía química generada por el gradiente de protones se disipa en forma de calor (Cannon y Nedergaard, 2004). Existen otras proteínas desacoplaentes (UCP2 y UCP3) implicadas en la regulación de la producción de ROS, como mecanismo de protección ante el estrés oxidativo (Brand y Esteves, 2005).

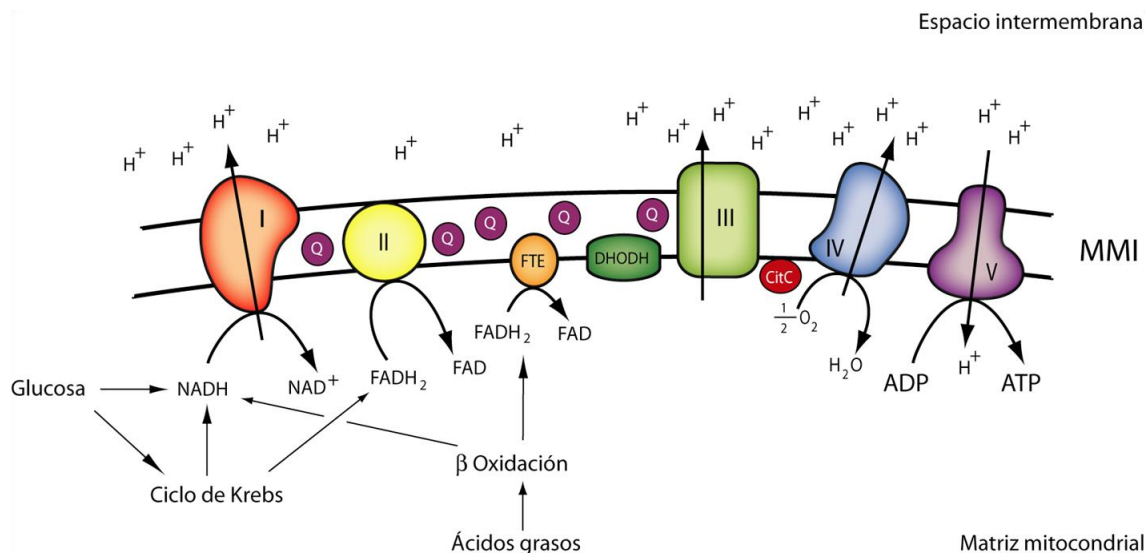


Figura 1. Representación esquemática del sistema OXPHOS, a través del cual las coenzimas reducidas provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O₂. El gradiente de protones generado se transforma en energía química que es utilizada por el complejo V ATP sintasa, para la producción de ATP. FTE: flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa, DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa, CitC: citocromo C y Q: ubiquinona.

2. Estructura y metabolismo del ADN mitocondrial.

2.1. Genoma mitocondrial.

Aunque han pasado cinco décadas desde el descubrimiento del ADNmt (Nass y Nass, 1963) y actualmente se ha secuenciado completamente el ADNmt de cientos de especies diferentes, aún se desconocen muchos aspectos sobre los mecanismos implicados en regular su replicación y expresión.

Cada mitocondria contiene su propio genoma en un número de copias variable. El ADNmt es una molécula circular de doble cadena, que se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados nucleoides por analogía a los cromosomas bacterianos (Bogenhagen et al., 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. En humanos se han descrito 27 proteínas presentes en los nucleoides junto al ADNmt; de éstas, 11 están directamente implicadas en la replicación y transcripción del ADNmt (Wang y Bogenhagen, 2006). Estudios realizados en levadura sobre los mecanismos que controlan la segregación

de los nucleoides apuntan a la existencia de una maquinaria dedicada a coordinar dicha segregación con la dinámica mitocondrial y la división celular (Chen y Butow, 2005).

En humanos, la molécula de ADNmt tiene un tamaño de 16549 pares de bases y su secuencia completa fue publicada en 1981 (Anderson et al., 1981). Su capacidad codificante es muy limitada puesto que codifica exclusivamente 37 genes: 13 polipéptidos que forman parte de complejos OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt). Las trece proteínas codificadas en el genoma mitocondrial son subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS: 7 subunidades (MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4L, MT-ND4, MT-ND5 y MT-ND6) de las 44 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una (citocromo b, MT-CYB) de las 11 del complejo III (complejo bc₁), tres (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3) de las 14 del complejo IV (citocromo c oxidasa) y dos (MT-ATP6 y MT-ATP8) de las 17 proteínas que forman el complejo V (ATP sintasa) (Fernández-Vizarra et al., 2009; Balsa et al., 2012) (Figura 2).

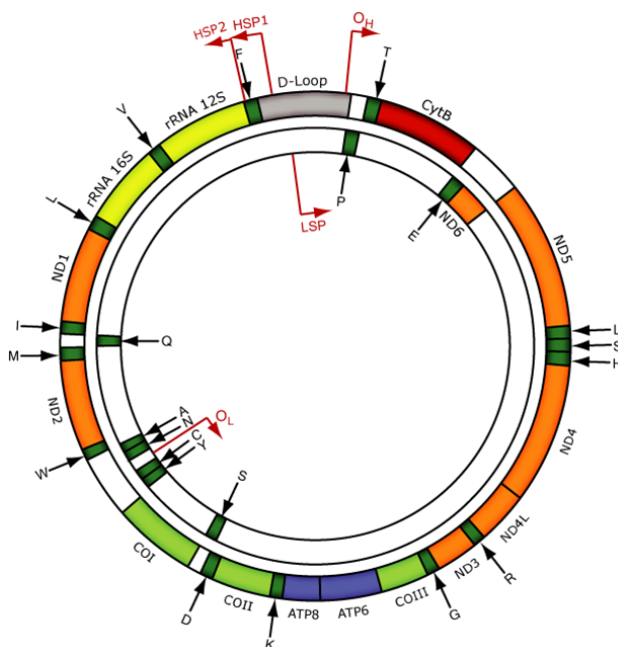


Figura 2. Representación del ADN mitocondrial humano. En el exterior se representa la cadena pesada y en el interior la cadena ligera. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada (O_H) y ligera (O_L), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP, HSP1 y HSP2).

En mamíferos, la composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), la otra se denomina cadena ligera (L). Algunas de las características del ADNmt se pueden considerar consecuencias evolutivas de su pasado. Los genes estructurales del ADNmt no poseen ni 5' ni 3' UTR, no contiene intrones y los espacios intergénicos son mínimos, llegando, en algunos casos, a solaparse entre ellos. En la única región no codificante, que en mamíferos se denomina D-loop, se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP) (Falkenberg et al., 2007).

2.2. Replicación del ADNmt.

La biogénesis mitocondrial es un proceso clave en la proliferación celular y la replicación del ADNmt es un componente esencial de dicho proceso. A pesar de que la masa mitocondrial por célula permanece constante en cada tipo celular, no parece que la replicación del ADNmt esté estrictamente coordinada con la del ADN nuclear. El ADN nuclear sufre una única duplicación durante la fase S del ciclo celular. Sin embargo, durante procesos como el de la embriogénesis y la diferenciación celular se produce más de una duplicación de ADNmt durante el ciclo celular, en respuesta a variaciones en la demanda energética y al recambio de las mitocondrias. En tejidos postmitóticos, como músculo y sistema nervioso, se produce replicación del ADNmt sin que exista división celular ni replicación del ADN nuclear. Es más, durante la oogénesis sólo se replica una fracción de la población previamente seleccionada (Poulton y Marchington, 2002).

Mientras que en la replicación del ADN nuclear participan un gran número de complejos multienzimáticos, el número de proteínas esenciales para la replicación del ADNmt es comparativamente pequeño (Kaguni, 2004). Existen dos modelos de replicación del ADNmt. Inicialmente, DA Clayton propuso el modelo de replicación asimétrica y asincrónica (Clayton, 1982). En dicho modelo, la replicación comienza en el origen de replicación de la cadena pesada O_H . Cuando el bucle de desplazamiento originado llega al origen de replicación de la cadena ligera O_L , comienza la replicación de esta cadena en sentido opuesto. Ambas cadenas se sintetizan de manera continua. Posteriormente se propuso por I. Holt y H. Jacobs un modelo alternativo de replicación (Holt et al., 2000). En este modelo, la replicación del ADNmt ocurriría de manera simétrica y simultánea en ambas cadenas, desde múltiples orígenes situados en una región amplia cercana al O_H (Bowmaker et al., 2003). Actualmente no existen evidencias experimentales suficientes que permitan descartar ninguno de los dos modelos, existiendo una gran controversia entre los defensores de ambos (Bogenhagen y Clayton, 2003; Bogenhagen et al., 2003; Holt y Jacobs, 2003; McKinney y Oliveira, 2013).

Independientemente del mecanismo, el estudio de la maquinaria implicada en la replicación del ADNmt se ha centrado en cuatro proteínas: las dos subunidades que forman parte de la ADN polimerasa mitocondrial o polimerasa γ (POLG), responsable de la síntesis de ADN en procesos de replicación y reparación; una helicasa (Twinkle), encargada de la ruptura de enlaces de hidrógeno de las dos cadenas del ADNmt, permitiendo la acción de POLG (Spelbrink et al., 2001); y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (SSBP1), encargada de estabilizar las cadenas sencillas de ADN, incrementando la fidelidad y procesividad de POLG (Kaguni, 2004). El replisoma mínimo necesario para la replicación del ADNmt en mamíferos, se ha reconstruido *in vitro*, con sólo dos componentes: la ADN polimerasa γ y la helicasa twinkle. A su vez, la presencia de SSBP1 incrementa la procesividad hasta niveles similares a los observados *in vivo* (Korhonen et al., 2004). Por tanto, la unidad replicativa mínima consta de tres factores esenciales: SSBP1, twinkle y POLG.

2.3. Transcripción del ADNmt

A diferencia del genoma nuclear, que se transcribe fundamentalmente por tres ARN polimerasas multiméricas y del bacteriano, que se transcribe por un complejo multiproteico de 6 subunidades, el ADNmt se transcribe por una única ARN-polimerasa monomérica, relacionada evolutivamente con las polimerasas de los bacteriófagos T3 y T7. Los promotores de la transcripción mitocondrial están localizados en la región de control del ADNmt y se denominan LSP, el de la cadena ligera, y HSP1 y HSP2, los de la cadena pesada (Bonawitz et al., 2006). La transcripción del genoma mitocondrial genera un único transcrito policistrónico de cada una de las cadenas de la molécula de ADNmt, además de un transcrito de menor tamaño que codifica los dos ARN ribosómicos. La maduración de los transcritos primarios policistrónicos es un proceso que requiere pocas enzimas y que se realiza de acuerdo con el modelo de puntuación por ARNs de transferencia (Montoya et al., 1981). Según este modelo, la estructura secundaria que adoptan los ARNt en los ARN policistrónicos marca los sitios de procesamiento. Tras el corte endonucleolítico realizado por ARNasas mitocondriales, como la ARNasa tipo P, se generan las moléculas individuales de ARNm, ARNr y ARNt. En mamíferos, el inicio de la transcripción a partir de los promotores mitocondriales requiere la presencia simultánea de la ARN-polimerasa mitocondrial, del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y, alternativamente, del factor de transcripción mitocondrial B1 o B2 (TFB1M y TFB2M) (Gaspari et al., 2004).

2.4. Traducción del ADNmt.

Los componentes responsables de la traducción mitocondrial son diferentes a los responsables de la traducción citosólica, y están más relacionados a los de bacterias, sin embargo, los mecanismos de traducción siguen los mismos pasos principales: iniciación, elongación, terminación y reciclado del ribosoma.

Los procesos de traducción mitocondrial comienzan con la separación de las dos subunidades del mitorribosoma 55S (28S y 39S) y la formación del complejo de iniciación. En la iniciación intervienen el ARNt-fMet, MTIF2, MTIF3 y el ARNm que se va a unir al sitio peptidil (P) del mitorribosoma. En cuanto se liberan los factores de iniciación comienza la elongación. En ella, los factores de elongación mitocondrial TSFM, TUFM y GFM1, intervienen en la traslocación del mitorribosoma permitiendo el movimiento de un nuevo ARNt aminoacilado del sitio A al sitio P, donde se cataliza el enlace peptídico. Cuando el codón de parada llega al sitio A, comienza la terminación, en la que interviene el factor de liberación mitocondrial MTRF1L, liberando la proteína del sitio. Como un paso final, los factores de reciclado mitocondrial mtRRF1 y mtRRF2 inducen la liberación del mRNA (Boczonadi y Horvath, 2014).

3. Enfermedades mitocondriales.

Dado el amplio número de procesos celulares en los que participa la mitocondria, no es extraño que los defectos en la fisiología mitocondrial estén asociados a un número de enfermedades y síndromes, cada vez más amplio, que abarcan prácticamente todas las especialidades médicas. El concepto de enfermedad mitocondrial data de 1962, cuando el grupo de Rolf Luft describió a una paciente con hipermetabolismo severo no debido a enfermedad tiroidea (Luft et al., 1962). A partir de la sistematización de los estudios bioquímicos fue posible una primera clasificación de las enfermedades mitocondriales en función de cuál de las 5 etapas principales del metabolismo mitocondrial estaban afectados: el transporte de sustratos, la utilización de sustratos, el ciclo de Krebs, la cadena de transporte electrónico y el acoplamiento oxidación/fosforilación (Dimauro, 2004). Más tarde, el uso del término enfermedad mitocondrial se empezó a restringir a aquellas enfermedades donde el defecto afectaba a la cadena respiratoria.

Las primeras mutaciones en el ADNmt se describieron en 1988. Se trataba de una delección en el ADNmt de pacientes con miopatía mitocondrial (Holt et al., 1988) y una mutación en el gen *MT-ND4* en una familia con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (Wallace et al., 1988). En 1989 se describió una familia donde la oftalmoplejía externa progresiva era heredada de manera autosómica dominante asociada a la presencia de delecciones múltiples en el ADNmt (Zeviani et al., 1989). Era la primera evidencia de un nuevo grupo de enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Esto hizo volver la mirada al núcleo y la primera mutación en el ADN nuclear asociada a enfermedad mitocondrial fue descrita en 1995 por el grupo de A. Munnich (Bourgeron et al., 1995). Se trataba de una mutación en una subunidad de la succinato deshidrogenasa en dos hermanas con síndrome de Leigh.

Cada año se describen nuevas mutaciones en ambos genomas y son identificados nuevos genes implicados a su vez en nuevos procesos, como aquellos que afectan a la fusión o fisión mitocondrial o a la composición lipídica de la membrana. Sin embargo aún se desconoce cuáles son los mecanismos patogénicos de las mutaciones conocidas, incluso de aquellas identificadas desde hace más tiempo, como son, por ejemplo, las mutaciones que afectan a los ARNt del ADNmt (Dimauro, 2004). Además, cada vez se dedica más atención al papel que pueda jugar la mitocondria en el desarrollo de las enfermedades metabólicas y degenerativas asociadas a la edad (Wallace, 2005). Desgraciadamente, un campo donde prácticamente no se han producido avances es en el de los tratamientos de estas enfermedades, a día de hoy claramente insuficientes cuando no inexistentes (DiMauro et al., 2006).

La epidemiología de las enfermedades mitocondriales es complicada dado el amplio espectro de presentaciones clínicas y la dificultad de asignar un origen definido a muchos de los fenotipos. Esto ha conducido tradicionalmente a una subestimación de la prevalencia de este grupo de enfermedades

(Schapira, 2006). En distintos estudios, se ha estimado una prevalencia de entre 4 y 10 pacientes, con manifestaciones clínicas de este grupo de enfermedades, por cada 100.000 habitantes en edad (Darin et al., 2001; Arpa et al., 2003; Skladal et al., 2003; Schaefer et al., 2008).

3.1. Mutaciones en el ADNmt.

3.1.1. Genética mitocondrial.

Para entender la patogénesis de las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt es necesario discutir aquellos aspectos que diferencian la genética mitocondrial de la mendeliana. Estos aspectos importantes son el porcentaje de heteroplasmia, la herencia materna y la segregación mitótica del ADNmt.

La heteroplasmia es la consecuencia de la naturaleza poliploide, de cientos a miles de copias del genoma mitocondrial por célula. De una manera simplificada, en homoplasmia todas las copias del genoma mitocondrial son idénticas y en heteroplasmia coexisten dos o más genotipos distintos. Esto conduce a otra de las características de la genética mitocondrial, la existencia de un nivel mínimo de copias con mutación, para que exista expresión fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial. Es lo que se conoce como efecto umbral (Taylor and Turnbull, 2005).

El ADNmt está sufriendo continuamente mutaciones y deleciones, que en la mayor parte de los casos nunca llegan a alcanzar niveles de heteroplasmia significativos, por lo que resultan normalmente indetectables, siendo el concepto de homoplasmia por lo tanto más aparente que real (Coller et al., 2001).

En los últimos años se ha puesto en duda el hecho de que el ADNmt se herede exclusivamente del linaje materno. En el año 2002 se publicó un trabajo donde se mostraban evidencias de herencia paterna en un paciente de miopatía mitocondrial esporádica con una microdelección en el gen *MT-ND2* (Schwartz y Vissing, 2002). Además, el estudio de este caso permitió demostrar la existencia de recombinación entre las dos poblaciones de ADNmt presentes en el paciente (Kraytsberg et al., 2004). Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado evidencias de herencia paterna en pacientes con miopatías mitocondriales esporádicas (Filosto et al., 2003; Taylor, McDonnell, et al., 2003). Así pues, se puede seguir considerando que como regla general el ADNmt se hereda de la madre, siendo los casos de herencia paterna un hecho excepcional.

Una mutación homoplásmica se transmite a toda la descendencia materna. Sin embargo, existen factores adicionales que hacen que la expresión del defecto mitocondrial pueda ser diferente entre los portadores de dicha mutación. Por ejemplo, muchos pacientes con LHON tienen mutaciones homoplásmicas en el ADNmt. Aunque toda la descendencia herede la mutación, sólo algunos, aproximadamente el 50% de los hombres y el 10% de las mujeres, desarrollaran la enfermedad, indicando que existen factores de origen

nuclear modulando la expresión fenotípica de estas mutaciones (Man et al., 2003). El caso de las mutaciones heteroplásmicas es aún más complicado. A los factores nucleares y medioambientales se une el hecho de que durante la oogénesis se produce un cuello de botella genético, consistente en la reducción temporal de la población mitocondrial, que hace que la cantidad de ADN mutado que hereda la descendencia sea variable (Taylor y Turnbull, 2005).

Hasta la fecha, no se conoce ningún mecanismo de distribución de las mitocondrias y el ADNmt durante el proceso de división celular. En consecuencia, se piensa que a partir de una condición inicial de heteroplasmia, las células van heredando al azar, moléculas con mutación y silvestres en distintas proporciones. Por ello los tejidos son un mosaico donde el ADNmt mutado es impredecible en cada individuo.

3.1.2. Tipos de mutaciones en el ADNmt.

Las mutaciones más comunes encontradas en el ADNmt son las deleciones y las mutaciones puntuales. La deleción más frecuente, conocida por ello como deleción común, tiene un tamaño de 5 Kb y abarca la región comprendida entre los genes *MT-CYB* y *MT-CO2*. Las deleciones de gran tamaño están asociadas usualmente a fenotipos que incluyen la oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO), el síndrome de Kearns-Sayre y el síndrome de Pearson, aunque han sido asociadas ocasionalmente con prácticamente todos los síndromes de encefalopatías mitocondriales. En algunos pacientes aparecen duplicaciones en el ADNmt que, aunque no son patogénicas por sí mismas, podrían ser un paso intermedio en la generación de deleciones (Schapira, 2006).

3.1.2.1. Mutaciones puntuales en el ADNmt.

Desde que se describió la primera mutación puntual en el ADNmt asociada a enfermedad (Wallace et al., 1988) se han descrito más de 250 mutaciones que afectan a los genes codificados en el ADNmt (Tuppen et al., 2010). Estas mutaciones afectan a los ARNt, a los ARNr y a los genes que codifican subunidades estructurales de los complejos OXPHOS (Dimauro, 2004).

La presentación clínica es muy variable e incluye fenotipos como el MELAS (miopatía con encefalopatía, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares), MERRF (epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas), NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa), MILS (síndrome de Leigh heredado por vía materna) y LHON. Además, los síndromes causados por mutaciones en el ADNmt pueden, muchas veces, acompañarse por diabetes mellitus, miocardiopatías, sordera neurosensorial y mioglobulinuria (Tuppen et al., 2010).

La mayoría de las mutaciones patogénicas son heteroplásmicas, correlacionando el grado de heteroplasma con la severidad del fenotipo. Esto ha hecho que tradicionalmente la heteroplasma fuera incluida como uno de los criterios canónicos para la clasificación de una mutación como patogénica a pesar de que existen numerosas mutaciones homoplásmicas asociadas a patología.

3.1.2.2. Mecanismos patogénicos.

El mecanismo patogénico de muchas de las enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt es actualmente desconocido, especialmente en lo que se refiere a mutaciones en los genes que codifican ARNt mitocondriales. Según la explicación convencional estas mutaciones producen un defecto en la biosíntesis de proteínas mitocondriales provocando un defecto OXPHOS y por lo tanto la causa de estos síndromes sería un defecto en la producción de energía en forma de ATP. Según esta explicación cabría esperar fenotipos parecidos para estas mutaciones, pero la realidad es que la misma mutación puede causar fenotipos distintos, y a su vez, un mismo fenotipo puede estar causado por distintas mutaciones (Schapira, 2006).

Por ejemplo, la mutación m.3243A>G es probablemente la causa más común de MELAS, pero también ha sido encontrada en pacientes con oftalmoplejía externa progresiva crónica, síndrome de Kearns-Sayre o diabetes mellitus aislada. A su vez la causa más frecuente de síndrome de Kearns-Sayre es la delección común del ADNmt, que a su vez se ha encontrado en pacientes con MELAS, diabetes mellitus aislada o miocardiopatía. Una posible explicación es que los síntomas reflejen el tejido en el que una mutación específica ha sobrepasado el umbral patogénico. Algunos tejidos parecen ser especialmente vulnerables a mutaciones específicas en ciertos ARNt; por ejemplo, el MERRF está asociado casi siempre a mutaciones en el ARNt-Lys; la miocardiopatía a mutaciones en el ARNt-Ile; la diabetes mellitus a una mutación en el ARNt-Glu. Pero la razón por la que unos tejidos son más vulnerables a ciertas mutaciones que a otras sigue siendo un completo misterio (Dimauro, 2004).

Existen evidencias de que la expresión de las mutaciones patogénicas puede estar modulada por el resto de la secuencia del ADNmt (Dimauro, 2004). De una manera más general, ciertos haplotipos podrían afectar a la fosforilación oxidativa, predisponiendo a, o protegiendo de ciertas enfermedades. Los haplotipos mitocondriales han sido asociados con miocardiopatías, enfermedad de Alzheimer, o enfermedad de Parkinson (Dimauro, 2004). En este sentido, algunos autores defienden que las variantes genéticas que permitieron a nuestros ancestros adaptarse a las distintas condiciones medioambientales, clima y alimentación principalmente, están teniendo una profunda influencia en la disposición a padecer enfermedades de la población actual (Wallace, 2005).

Así pues, la patogénesis de las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt parece ser el resultado de una combinación de la propia mutación, el resto de la molécula de ADNmt, el

fondo nuclear, factores medioambientales, la distribución de la mutación en los distintos tejidos y la dependencia de estos con respecto al sistema de fosforilación oxidativa.

3.2. Mutaciones en el ADN nuclear.

Considerando que actualmente la causa genética se desconoce en más del 50% de los pacientes diagnosticados de enfermedad mitocondrial, parece claro que la mayoría de las enfermedades mitocondriales son probablemente debidas a mutaciones en los genes nucleares que codifican alguna de las, aproximadamente, 1500 proteínas que forman el proteoma mitocondrial (Calvo et al., 2006). Hasta la fecha, se desconocen muchos de estos genes, lo que implica una gran dificultad a la hora de diagnosticar correctamente las enfermedades mitocondriales de origen nuclear.

Las mutaciones en genes nucleares que afectan de una manera directa a la cadena respiratoria pueden ser clasificadas en 4 grupos principales: mutaciones en genes que codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria; mutaciones en genes que codifican proteínas accesorias necesarias para el correcto ensamblaje y función de los complejos de la cadena; mutaciones que afectan a la estabilidad y replicación del ADNmt; y mutaciones que afectan a la traducción de proteínas mitocondriales.

Aparte de estos cuatro grupos, habría un quinto donde se incluirían aquellas mutaciones que afectan de un modo indirecto a la cadena respiratoria, como es el caso de mutaciones en el gen *TAZ* implicado en la biosíntesis del fosfolípido cardiolipina, provocando el síndrome de Barth, consistente en miocardiopatía, miopatía y neutropenia cíclica (Schlame et al., 2002).

3.2.1. Mutaciones en genes codificantes de las subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Aunque 77 de las 90 subunidades de los complejos que forman la cadena respiratoria están codificadas en el núcleo (Fernández-Vizarra et al., 2009; Balsa et al., 2012), las mutaciones en dichos genes son poco frecuentes. Esto podría ser un reflejo de la naturaleza altamente deletérea de dichas mutaciones, que darían lugar a letalidad durante la embriogénesis.

Hasta la fecha han sido descritas mutaciones en subunidades del complejo I (NDUFS1, 2, 4, 7 y 8, NDUFV1 y NDUF2), asociadas a síndrome de Leigh y leucodistrofia (Zeviani et al., 2003; Hoefs et al., 2008), y en las cuatro subunidades del complejo II (SDHA, B, C y D) asociadas a síndrome de Leigh y ataxia en el caso de la subunidad A, y más raramente a paraganglioma y feocromocitoma en el caso de las subunidades B, C y D (Zeviani et al., 2003). Aunque es menos frecuente, también se han encontrado

mutaciones en subunidades del complejo III (UQCRB, UQCRQ) asociadas a acidosis láctica, hipoglicemia y fenotipo neurológico severo (Haut et al., 2003; Barel et al., 2008); del complejo IV (COX6B1) asociada a encefalomiopatía (Massa et al., 2008); y del complejo V (ATP5E) asociada a neuropatía periférica, retraso mental y acidosis láctica (Mayr et al., 2010).

3.2.2. Mutaciones en genes codificantes de proteínas accesorias mitocondriales.

Las enfermedades debidas a defectos en los complejos III, IV y V de origen nuclear no suelen ser producidas directamente por mutaciones en las subunidades de estos complejos codificadas en el núcleo, sino por mutaciones en proteínas implicadas en su ensamblaje. Un ejemplo claro lo constituyen las deficiencias de la citocromo C oxidasa (COX) debidas a mutaciones en el ADN nuclear. Sólo se ha descrito una mutación en la subunidad COX6B1 de este complejo (Massa et al., 2008), codificada en el núcleo, mientras que son numerosas las mutaciones descritas en genes implicados en su ensamblaje y estabilidad, como son *SCO1*, *SCO2*, *SURF1*, *COX10*, *COX15* y *LRPPRG*. También han sido descritas mutaciones en los genes *AGPAT2*, involucrado en el ensamblaje del complejo III, y *ATPAF2*, implicado en el ensamblaje del complejo V (Schapira, 2006). Además se han descrito mutaciones en genes implicados en el ensamblaje del complejo I, como en el gen *NDUFAF2*, una mutación asociada a un cuadro de leucoencefalopatía (Ogilvie et al., 2005); en los genes *NUBPL* y *FOXRED1*, mutaciones asociadas a encefalomiopatía y a síndrome de Leigh respectivamente (Calvo et al., 2010); y en el gen *ACAD9*, asociada a encefalomiopatía y miocardiopatía hipertrófica (Haack et al., 2010).

3.2.3. Mutaciones en genes codificantes de las proteínas implicadas en el mantenimiento y replicación del ADNmt.

El ADNmt, para su correcta replicación, reparación y estabilización, depende de numerosas proteínas codificadas en el ADN nuclear. Mutaciones en estas proteínas pueden producir daños cuantitativos (depleción) o cualitativos (deleciones) en el ADNmt.

Entre las mutaciones asociadas a depleciones cabe destacar aquellas mutaciones en genes implicados en el metabolismo de nucleótidos: el gen que codifica la deoxiguanosina kinasa (*DGUOK*), asociada con el síndrome de depleción mitocondrial en su forma más severa (Mandel et al., 2001); el gen que codifica la timidina kinasa 2 (*TK2*), asociada con el síndrome de depleción mitocondrial con un menor grado de depleción del ADNmt (Saada et al., 2001); y el gen de la timidina fosforilasa (*TYMP*), asociada con el síndrome de encefalopatía mioneurogastrointestinal (MNGIE) (Nishino et al., 1999). Además, mutaciones en el gen *POLG*, también están asociadas a depleciones, como en el síndrome de Alpers-Huttenlocher, con un cuadro clínico de hepatoencefalopatía severa infantil (Naviaux y Nguyen, 2004).

Por otro lado, las mutaciones asociadas con deleciones del ADNmt, se encuentran en el gen *C10orf2*, que codifica la helicasa Twinkle (Spelbrink et al., 2001); en el gen *ANT1*, que codifica una isoforma del transportador de nucleótidos de adenina mitocondrial (Kaukonen et al., 2000); y en *POLG*, asociadas a oftalmoplejía externa progresiva, en su forma autosómica dominante (adPEO) (Van Goethem et al., 2001).

3.2.4. Mutaciones en genes implicados en la traducción de proteínas mitocondriales.

Las proteínas codificadas en el ADNmt necesitan de una correcta traducción para que los distintos complejos de la cadena respiratoria puedan cumplir su función. En dicho proceso de traducción mitocondrial es necesaria la implicación de distintas proteínas como son los factores de iniciación, elongación, liberación, proteínas ribosomales y proteínas implicadas en el reciclado ribosomal. Distintas mutaciones en estas proteínas son susceptibles de generar enfermedades mitocondriales.

En 2004, Miller y colaboradores identificaron la primera enfermedad humana relacionada con la síntesis de proteínas mitocondriales, causada por una mutación sin sentido en la proteína ribosomal MRPS16 codificada en ADN nuclear (Miller et al., 2004). Estudios posteriores, correlacionaban una deficiencia en la cadena respiratoria (CR) mitocondrial con mutaciones en genes implicados en la elongación de la traducción, como *GFM1*, *TUFM*, *TSFM*, y *C12orf65*. Además se han descrito casos en los que están implicadas mutaciones en proteínas modificadoras de ARN transferentes, como el caso de la tirosil (YARS2), aspartil (DARS2) y arginil (RARS2) ARNt sintetasas y la enzima modificadora de ARNt TRMU (Kemp et al., 2011). Sin embargo, hasta la fecha, el número de pacientes identificados con mutaciones en genes nucleares implicados en la traducción mitocondrial, es muy limitada.

3.3. Mitocondria y Miocardiopatías.

Las miocardiopatías son un grupo heterogéneo de afecciones del músculo cardíaco. Se han definido, por la Sociedad Europea de Cardiología en 2008, como la presencia de una estructura y/o función anómala, en ausencia de isquemia cardíaca o condiciones anómalas de llenado. En esta definición se excluyen las disfunciones miocárdicas debidas a causas coronarias, hipertensivas, valvulares y enfermedad cardíaca congénita (Jacoby y McKenna, 2012; Arbustini et al., 2013), siendo la miocardiopatía dilatada idiopática (MCDI) la causa más frecuente de insuficiencia cardíaca congestiva (Hughes y McKenna, 2005). En el mundo occidental es una enfermedad importante, que afecta tanto a niños como a adultos, con una incidencia anual de 2-8 casos/100.000 habitantes (Zeviani et al., 1995; Hughes y McKenna, 2005). Desde el punto de vista genético son enfermedades relativamente frecuentes, de herencia mendeliana o materna, y con una penetrancia variable: la miocardiopatía hipertrófica (MCH) aparece en 1 de cada 500

personas en la población general (Charron y Komajda, 2006) y 1/3 de los casos de miocardiopatía dilatada (MCD) son de origen familiar (Chang y Potter, 2005; Hughes y McKenna, 2005).

La clasificación de las distintas cardiopatías ha cambiado mucho a lo largo del siglo XX. Inicialmente, Blankenhorn y Gall en 1956 propusieron la clasificación de miocarditis para la afección inflamatoria del músculo cardíaco, y miocardiosis para otras afecciones del músculo cardíaco. El término de miocardiopatía se empezó a utilizar por Brigden un año después, para definir la afección no coronaria, poco común, del músculo cardíaco (Brigden, 1957). Más tarde, Goodwin y Oackley definieron las miocardiopatías como afecciones del miocardio de origen desconocido, y propusieron las categorías basadas en características morfofuncionales de: miocardiopatía dilatada (MCD), hipertrófica (MCH) y restrictiva (MCR), que hoy en día todavía se utilizan (Goodwin y Oakley, 1972). Tras distintas revisiones de la clasificación se añadió la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MAVD), actualmente también denominada miocardiopatía arritmogénica (MCA); la miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (NCVI); y miocardiopatía no clasificada. Recientemente se ha propuesto la clasificación MOGE(S) en la que se hace referencia al fenotipo morfofuncional, a los órganos afectados, al tipo de herencia genética, a la etiología y/o al estadio de insuficiencia cardíaca. Esta última clasificación permite ver toda la información asociada a cada caso clínico, permitiendo nuevas nomenclaturas en un futuro y resolviendo la dificultad que ha habido a lo largo del tiempo para clasificar las miocardiopatías. Sin embargo, la clasificación de la Sociedad Europea de Cardiología de 2008, mostrada en la figura 3, sigue siendo la más ilustrativa a la hora de comprender las distintas miocardiopatías desde un punto de vista genético. Actualmente, en cuanto a la clasificación morfofuncional, se considera que la MCR está relacionada con la MCH y la MCD; y que la NCVI está relacionada con la MCD (Arbustini et al., 2013).

Las miocardiopatías pueden tener una etiología diversa, como el caso de la MCD, que puede ser causada por una infección o por tratamientos con fármacos citotóxicos y, probablemente, se ha subestimado la MCD familiar, debida a alteraciones genéticas. Sin embargo, desde la identificación de una mutación en la actina cardíaca en 1998 (Olson et al., 1998), se han identificado más de 40 genes asociados a MCD familiar. En el caso de la MCH, se ha asociado desde un principio a una causa genética y se han identificado más de 400 mutaciones en distintos genes asociados a MCH (Jacoby y McKenna, 2012), esto remarca la importancia de profundizar en la etiología genética de las distintas miocardiopatías. Además, es importante remarcar que mutaciones en un gen determinado pueden generar distintos tipos de miocardiopatías; como en el caso de proteínas desmosomales que causan MCD y MCA, o en el de proteínas sarcoméricas, implicadas en MCH, MCR y MCD, lo cual señala su complejidad y hace más necesario estudiar los mecanismos genéticos implicados (Jacoby y McKenna, 2012).

Desde el punto de vista molecular se distinguen dos categorías: miocardiopatías producidas por anomalías en las proteínas estructurales y contráctiles del miocardio; y miocardiopatías producidas por defectos en el metabolismo energético del corazón, incluyendo, entre ellas las miocardiopatías de origen

mitocondrial (MCM). En el caso de las MCM, las manifestaciones cardíacas pueden llegar a pasarse por alto, al dar más importancia a las manifestaciones neurológicas, hasta que ya es demasiado tarde (Hollingsworth et al., 2012). Por este motivo es necesario el estudio de las MCM y, además, es importante comprender otros mecanismos implicados en el desarrollo de miocardiopatías, como son los de las mutaciones en proteínas sarcoméricas, para alcanzar un mayor entendimiento de estas enfermedades.

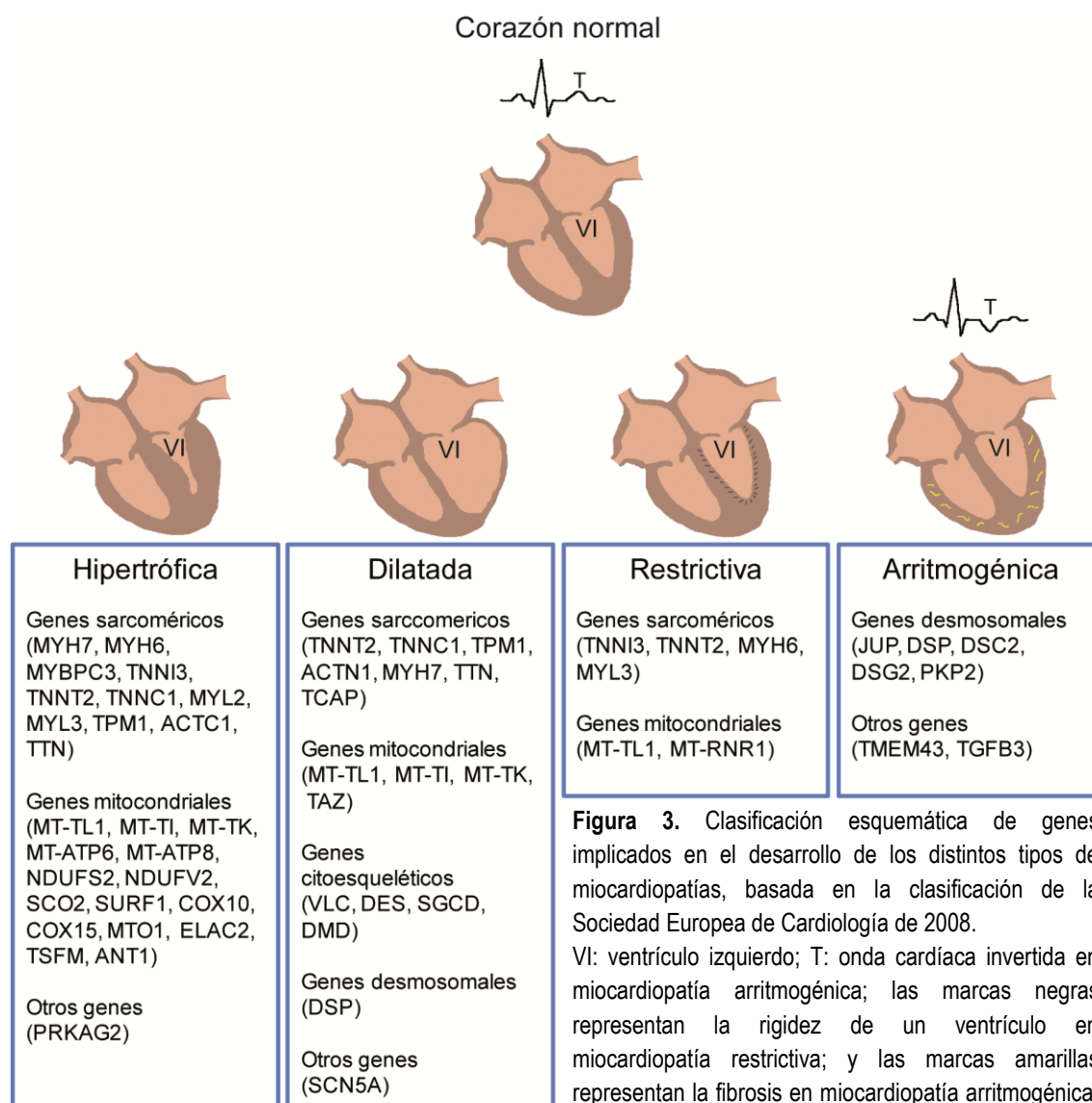


Figura 3. Clasificación esquemática de genes implicados en el desarrollo de los distintos tipos de miocardiopatías, basada en la clasificación de la Sociedad Europea de Cardiología de 2008. VI: ventrículo izquierdo; T: onda cardíaca invertida en miocardiopatía arritmogénica; las marcas negras representan la rigidez de un ventrículo en miocardiopatía restrictiva; y las marcas amarillas representan la fibrosis en miocardiopatía arritmogénica. Figura modificada de Jacoby & McKenna 2012.

3.3.1. Miocardiopatías de origen mitocondrial.

Como se ha mencionado previamente la afectación cardíaca, ya sea en forma de MCH o MCD, no es una manifestación infrecuente dentro de las EM y su prevalencia posiblemente esté infravalorada por la dificultad en su diagnóstico.

En 1991 se describió el primer síndrome clínico con afectación cardiovascular, denominado MIMyCa (miopatía y miocardiopatía de herencia materna) y asociado a una mutación en el gen *MT-TL1* (Zeviani et al., 1991). Desde entonces, se han encontrado mutaciones en genes del ADNmt asociadas a distintas miocardiopatías. Las mutaciones más comunes asociadas a MCM se encuentran en genes que codifican ARNt, como los genes *MT-TL1*, *MT-TI* y *MT-TK* (Bates et al., 2012). En concreto, la más común es la mutación m.3243A>G en el gen *MT-TL1*, que codifica el ARNt-Leu (UUR) mitocondrial, la cual se ha encontrado asociada a MCD (Stalder et al., 2012); MCR (Thebault et al., 2008); NCVI (Finsterer, 2009; Tang et al., 2010) y MCH (Majamaa-Voltti et al., 2002). Por tanto esta mutación, presente en 1 de cada 300 individuos de la población general, y que causa enfermedad en 1 de cada 5000 (Bates et al., 2012), es un claro ejemplo de una mutación que puede causar distintas miocardiopatías, mostrando la complejidad de los mecanismos implicados en su patogenicidad. Principalmente, las mutaciones que se han asociado con MCH son mutaciones en los genes *MT-TI*; *MT-TK* (Bates et al., 2012); y *MT-TL1* (Palecek et al., 2012). Sin embargo, también se ha asociado a MCH infantil, mutaciones en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8* (Pastores et al., 1994; Ware et al., 2009), que codifican subunidades del complejo V de la CR. Las mutaciones previamente mencionadas en el gen *MT-TI*, se han asociado también a casos de MCD (Taniike et al., 1992). Además se han encontrado otras mutaciones en el ADNmt asociadas a tipos menos comunes de miocardiopatías como una mutación en el gen *MT-RNR1*, que codifica el ARN 12S del ribosoma mitocondrial, asociada a MCR (Santorelli et al., 1999); una mutación en el gen *MT-ND1*, asociada a NCVI (Tang et al., 2010); y una mutación en el gen *MT-CYB*, asociada a miocardiopatía histiocitoide (Andreu et al., 2000).

Como en cualquier EM, mutaciones en genes nucleares también pueden estar implicadas en el desarrollo de MCM, principalmente en MCH. Entre estas mutaciones, se encuentran mutaciones en genes codificantes de diferentes subunidades del complejo I de la CR (*NDUFS2* y *NDUFV2*) (Loeffen et al., 2001; Bénit et al., 2003) y en genes codificantes de factores implicados en el ensamblaje del complejo IV, como son *SCO2*, *SURF1*, *COX10* y *COX15* (Papadopoulou et al., 1999; Antonicka, Leary, et al., 2003; Antonicka, Mattman, et al., 2003). Teniendo en cuenta la implicación de los ARNt en el desarrollo de miocardiopatías, es interesante mencionar mutaciones, recientemente descritas en genes nucleares implicados en la traducción, que causan MCH; como es el caso de los genes *MTO1* (Ghezzi et al., 2012), *ELAC2* (Haack et al., 2013) y *TSMF* (Vedrenne et al., 2012).

Por tanto, se hace evidente, en el campo de las EM con expresión fenotípica predominante en músculo cardíaco, la necesidad de la búsqueda de mutaciones en genes nucleares implicados en la biogénesis mitocondrial, sin menospreciar por ello el análisis del ADNmt.

3.3.2. Miocardiopatías asociadas a mutaciones en genes nucleares codificantes de proteínas sarcoméricas y citoesqueléticas.

En los últimos 20 años, los avances técnicos asociados a la secuenciación del genoma humano han permitido la identificación de las causas moleculares de un porcentaje amplio de miocardiopatías familiares monogénicas, y se ha podido establecer una clasificación genética de las mismas en función de las proteínas defectuosas; así se habla de miocardiopatías sarcoméricas (por mutaciones en los genes codificantes de miosinas, tropomiosinas y troponinas, responsables aproximadamente del 50% de los casos de MCH) y citoesqueléticas (distrofina, desmina, actina y δ -sarcoglicano) (Seidman y Seidman, 2001; Rampazzo et al., 2002; Thiene et al., 2005).

Algunos de los genes sarcoméricos en los que se han encontrado mutaciones causantes de MCH son los genes de la cadena pesada de la β -miosina (*MYH7*), cadena pesada de la miosina α (*MYH6*), proteína C fijadora de la miosina (*MYBPC3*), Troponina I (*TNNI3*), Troponina T (*TNNT2*), Troponina C (*TNNC1*), cadena ligera reguladora 2 de la miosina (*MYL2*), cadena ligera esencial 1 de la miosina (*MYL3*), α -Tropomiosina (*TPM1*), Actina alfa cardíaca (*ACTC1*) y Titina (*TTN*) (Maron et al., 2006).

En estudios previos, en series de pacientes europeos y norteamericanos (Richard et al., 2003; Driest et al., 2005), se deduce que aproximadamente el 25% de los casos de MCH son causados por mutaciones en el gen *MYH7*, otro 25% por mutaciones en *MYBPC3*, un 5% por mutaciones en *TNNT2*, otro 5% en *TNNI3* y un 3% por mutaciones en los genes *TPM1*, *MYL3* y *MYL2* (Richard et al., 2003; Driest et al., 2004). Más recientemente se ha descrito en pacientes egipcios con MCH que el 40% de los casos se debían a mutaciones en los genes *MYBPC3*, *MYH7* y *TNNI3*, siendo las mutaciones en *MYBPC3* las más frecuentes (Kassem et al., 2013). Además en otro estudio, con datos similares en pacientes portugueses con MCH, se observó que el 66% de los casos se debían a mutaciones en *MYBPC3*, el 22% a *MYH7*, el 12% en *TNNT2* y minoritariamente en mutaciones en el gen *TNNI3* (Brito et al., 2012). Mutaciones en el resto de los genes sarcoméricos han sido descritas sólo de forma excepcional. Se considera que hasta el 5% de los pacientes pueden presentar mutaciones en dos genes sarcoméricos diferentes (Richard et al., 2003; Driest et al., 2004).

En el estudio de Garcia-Pavia et al., (2011), se analizaron genéticamente los genes sarcoméricos de una cohorte de 26 pacientes sometidos a Trasplante Cardíaco por MCH. Los resultados de este trabajo han mostrado que 13 de los pacientes tenían alteración genética en genes sarcoméricos. Entre las alteraciones genéticas documentadas, hemos identificado una nueva mutación no descrita previamente,

p.Gly128Cys en el exón 4 del gen que codifica la isoforma ventricular de la cadena ligera esencial de la miosina (*MYL3*), como posible responsable de MCH en uno de estos pacientes. El aminoácido glicina en esta posición está estrictamente conservado en la evolución apoyando fuertemente la posible patogenicidad de esta mutación. Consideramos por tanto que la mutación p.Gly128Cys puede ser un excelente candidato para llevar a cabo un estudio de patogenicidad en un modelo de ensayo funcional. En la proteína *MYL3*, además, se han descrito previamente otras mutaciones, sobre las que se han realizado distintos estudios (Sanbe et al., 2000; Lee et al., 2001), y son sospechosas de estar implicadas en MCH.

Curiosamente, al igual que ocurre con las mutaciones en genes mitocondriales, mutaciones en los mismos genes sarcoméricos pueden ser responsables simultáneamente de diferentes tipos de miocardiopatía. Se han encontrado asociadas, tanto a MCH como a MCD, mutaciones en *TNNT2*, *TNNC1*, *TPM1*, *ACTC1*, *MYH7* y *TTN*. Además, mutaciones en *TNNI3* se han encontrado en casos de MCH y MCR (Morimoto, 2009) y mutaciones en genes ya mencionados como *MYBPC3*, *TPM1*, *MYH7*, *ACTC1* y *TNNT2* se han encontrado en casos de NCVI (Klaassen et al., 2008; Probst et al., 2011).

3.4. Modelos animales y celulares en el estudio de enfermedades mitocondriales y miocardiopatías hipertróficas familiares.

La limitada disposición de muestras humanas, hace necesario el uso de organismos modelo para el estudio de la patogénesis de enfermedades mitocondriales, y también de miocardiopatías debidas a mutaciones sarcoméricas. Con este objetivo, en el caso de las enfermedades mitocondriales, se han usado hasta la fecha diferentes organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o *Mus musculus* (Larsson y Rustin, 2001). Entre ellos el ratón es el que ofrece más ventajas al ser el más cercano a los humanos tanto a nivel genético como fisiológico y morfológico.

La utilidad de estos modelos se ha restringido hasta el momento al estudio de mutaciones en el ADN nuclear, dada la enorme dificultad, cuando no imposibilidad, de obtener modelos de enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en el ADNmt.

Sin embargo, en el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en ADNmt, el sistema que se ha mostrado más útil hasta el momento es el de los cíbridos transmitocondriales (Taylor y Turnbull, 2005). En este sistema, líneas celulares humanas cuyo ADNmt ha sido completamente eliminado (células ρ^0), son repobladas con mitocondrias procedentes de un paciente o donante. Las células ρ^0 no poseen una cadena respiratoria funcional y dependen de piruvato y uridina exógenos para crecer, lo que permite la fácil selección de los transformantes que contienen el ADNmt del individuo en estudio (King y Attardi, 1989). Este sistema ha permitido el estudio de las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de mutaciones en el ADNmt (Pallotti et al., 2004; Vives-Bauza et al., 2006). También ha sido

utilizado para estudiar el efecto del fondo genético nuclear sobre la segregación de mutaciones patogénicas (Dunbar et al., 1995), o para demostrar la presencia de recombinación heteróloga en el ADNmt en células humanas (D'Aurelio et al., 2004), aunque algunos autores indican que la recombinación del ADNmt es prácticamente nula (Hagström et al., 2014). En nuestro laboratorio el modelo de híbridos transmitocondriales ha sido ampliamente utilizado en la caracterización de mutaciones en el ADNmt (Bornstein et al., 2002, 2005).

Por otro lado, en el estudio de la patogénesis de las miocardiopatías debidas a mutaciones en proteínas sarcoméricas, también se han empleado distintos modelos animales, como *danio rerio*, *mus musculus* y *oryctolagus cuniculus* (Sanbe et al., 2000; James et al., 2002; Klaassen et al., 2008), en los que se analizan distintas mutaciones, mediante sobreexpresión de la proteína afectada. Sin embargo, lo altamente costoso de utilizar animales transgénicos, ha hecho que en muchos casos, para establecer la patogenicidad de una mutación en miocardiopatías, su análisis se limite a valorar si la mutación se produce en un residuo conservado entre especies. Por ello, es de gran importancia el desarrollo de un modelo que permita evaluar la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas, sin la necesidad de emplear animales transgénicos.

El hecho de poder disponer de sistemas experimentales que nos ayuden a comprender las consecuencias moleculares y metabólicas de los defectos mitocondriales y sarcoméricos, es de vital importancia a la hora de elucidar los mecanismos patogénicos, decidir tratamientos eficaces y desarrollar terapias racionales para estas enfermedades (J. A. Smeitink et al., 2006), por lo que desarrollar modelos de estudio que nos permitan aproximarnos a las miocardiopatías con facilidad y fiabilidad es una cuestión del máximo interés.

Objetivos

Las miocardiopatías hereditarias son un grupo de enfermedades cardiovasculares clasificadas en base a su morfología y función ventricular que incluyen la miocardiopatía hipertrófica, dilatada, arritmogénica, no compactada del ventrículo izquierdo y restrictiva. Desde que se identificó la patogenicidad de mutaciones en genes sarcoméricos se han hecho muchos avances definiendo la etiología genética que subyace a las miocardiopatías, llegando a identificar un gran número de mutaciones en genes estructurales, como los sarcoméricos, y en genes relacionados con el metabolismo celular, como los genes mitocondriales. Muchos de los casos descritos de miocardiopatías mitocondriales se han asociado con trastornos neurológicos, lo cual se explica por la elevada demanda energética oxidativa que tienen los tejidos cardíaco y neuronal. Sin embargo, el hecho de que las características clínicas neuromusculares dominen la presentación clínica de las enfermedades mitocondriales hace que se suelen pasar por alto las manifestaciones cardíacas. Esto demuestra que la caracterización de las MCM sigue siendo incompleta y, por tanto, es necesario comprender los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de miocardiopatías.

El objetivo principal de este trabajo es la identificación y caracterización de mutaciones, novedosas y ya descritas en genes mitocondriales y sarcoméricos, que estén asociadas a miocardiopatías. Para cumplir este objetivo principal se han seguido los objetivos específicos siguientes:

1. Realizar un estudio retrospectivo en pacientes con sospecha de MCM para identificar posibles mutaciones patogénicas, tanto en el ADNmt como en genes mitocondriales de origen nuclear, en muestras de estos pacientes.
2. Evaluar la patogenicidad de las mutaciones identificadas en pacientes con MCM mediante la generación de híbridos transmitocondriales.
3. Desarrollar paralelamente un ensayo funcional *in vitro* que permita caracterizar nuevas mutaciones en genes codificantes de proteínas sarcoméricas.

Materiales y Métodos

1. Materiales.

1.1. Reactivos, soluciones y tampones.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para su utilización en Biología Molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o en la bibliografía correspondiente.

1.2. Líneas celulares.

En la generación de híbridos mitocondriales se utilizó la línea 143B 206 (p^0), con el ADNmt previamente deplecionado mediante largas exposiciones a bajas concentraciones de bromuro de etidio (King y Attardi, 1989), modificada con resistencia a puromicina (Carrozzo et al., 2004) derivada de la línea de osteosarcoma humano 143B TK⁻, y cedida amablemente por la Dr. Rosalba Carrozzo (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroriabilitazione, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia)

En el desarrollo de un estudio funcional de las mutaciones sarcoméricas en cardiomiocitos se utilizó la línea de células ES AMPIGX7, generada por A. Sachinidis a partir de la línea ES CGR8 (Akasha et al., 2008), amablemente cedida por el Dr. A. Carrodegua (Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos, Universidad de Zaragoza, España).

1.3. Cepas bacterianas.

En la transformación y amplificación de los distintos plásmidos generados se utilizó la cepa E.coli DH5 α (Sambrook y Russell, 2001).

1.4. Vectores.

En la construcción de los plásmidos empleados para la transfección de células ES se utilizaron los siguientes vectores:

TOPO cloning vector: vector de clonaje de productos de PCR (Life Technologies).

pcDNA4/TO: vector de expresión en mamíferos con gen de resistencia a zeocina (Life Technologies)

1.5. Radioisótopos.

El compuesto ATP [γ - ^{32}P] para el marcaje de sondas radioactivas fue suministrado por PerkinElmer, y se utilizó bajo la autorización del Servicio de Protección Radiológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols.

1.6. Oligonucleótidos.

Las secuencias nucleotídicas, de los oligonucleótidos empleados, se presentan a continuación en sentido 5'-3'.

1.6.1. Oligonucleótidos para la secuenciación del ADNmt.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del ADNmt son propiedad intelectual de Secugen, S.L.

1.6.2. Oligonucleótidos para la secuenciación de los 13 genes nucleares candidatos, implicados en la función mitocondrial.

NDUFV2-1F	5'CCCAAGGTGCAGCTCCGG3'
NDUFV2-1R	5'TCGACCAAAGTAGGAGTACAC3'
NDUFV2-2F	5'GGTTCTCCTATTGACTCGTG3'
NDUFV2-2R	5'GGTTCAACTGGAACCAACATC3'
NDUFV2-3F	5'GTACAGTGTCAATCACACTTG3'
NDUFV2-4R	5'GCTAAAGGGCTCCAAAATCC3'
NDUFV2-5F	5'CTCCCAGTTATCCAAGACAAG3'
NDUFV2-5R	5'GATGTGGAAACACAGTAACAC3'
NDUFV2-6F	5'CTGGTCCTTAGAGTGTTTATTG3'
NDUFV2-6R	5'CTCTCAGTTAAGTCCTGATAG3'
NDUFV2-7F	5'CCATGCGTGGTGGTTCATAC3'
NDUFV2-7R	5'CCAAAGCTCCTACCAATTCC3'
NDUFV2-8F	5'CTCTTGTGAGGTAACCATTAC3'
NDUFV2-8R	5'CTGCAAGTTGCTACGGTTAG3'

NDUFS2-1F	5'CAGATACAATCCGAGAGCAGG3'
NDUFS2-1R	5'GAGAAAGTGTGTCGAGAGCTG3'
NDUFS2-2F	5'GGAACCAAACTGTTTCAGGC3'

NDUFS2-2R	5'CTACAGTGAGCCACTTTTCGC3'
NDUFS2-3F	5'GAATAACCATGTGGCTCTGAAC3'
NDUFS2-3R	5'CTAATGACTCAAGCATCCCCTG3'
NDUFS2-4F	5'CTAGAAAGGCTTATACAGCAC3'
NDUFS2-5R	5'ATAGTTTCTACAAATATAACCCAAG3'
NDUFS2-6F	5'TGGGGGCTGGGACTTTGAC3'
NDUFS2-8R	5'GTCTTCAAAGACAAGATATTAGGC3'
NDUFS2-9F	5'TCCTAGTCATACCCTGAATGTG3'
NDUFS2-9R	5'CTGGAATATCAGCCAAGAAAGG3'
NDUFS2-10F	5'AGCCAAGCAGAGATGCTGTAC3'
NDUFS2-10R	5'GCCGAGATTGCACTCCAGTC3'
NDUFS2-11F	5'CATGTGGCTTTAGTCTCCCTG3'
NDUFS2-13R	5'TGGAGTTATAGTTACTGGGATTG3'
NDUFS2-14F	5'GATGCAAGATCAAGGCTCCTG3'
NDUFS2-14R	5'CCAGAACCCATTACTGTGCTC3'

NDUFA2-1F	5'CGAGCGCAAAGAAATTGACC3'
NDUFA2-1R	5'CTCAACTTCAGGGAGGTGCG3'
NDUFA2-2F	5'CTGCGTGAGATTCGCATCC3'
NDUFA2-2R	5'CAACAGCAAGGCTAAAGTCC3'
NDUFA2-3F	5'CTCTTCCTGTCTTAACAAGAC3'
NDUFA2-3R	5'CATGTCAGAACTTCATCCTC3'

TSFM-1F	5'CCAGCAGGTGGCACCATAC3'
TSFM-1R	5'GAAGGTGAGATGGAGTCAAAC3'
TSFM-2F	5'GTTTGACTCCATCTCACCTTC3'
TSFM-2R	5'CCCAAGAGTCTGAGGTCGAG3'
TSFM-3F	5'GGCATTAGTGGTAGACTGC3'
TSFM-3R	5'CCTTTAGGGCCTACTACAAG3'
TSFM-4F	5'GAGTCTGTAGCTTGTCTATC3'
TSFM-4R	5'GCATGACACGGGGATATAGC3'
TSFM-5F	5'GCATTCCCATCAAAAATGTGC3'
TSFM-5R	5'CAATTACATTCCACTCTCATC3'
TSFM-6F	5'GTACAGAATCAGTTCATGTTTG3'
TSFM-6R	5'CTGACCCTGTAGGCACATG3'
TSFM-7F	5'GGTACCATCACAGACATCAC3'
TSFM-7R	5'GTTCTCCACGACACTATCAC3'

TUFM-1F	5'CTGAGACGGCCATAGACAC3'
TUFM-2R	5'GCCACAGTAACTCCTCCAG3'

TUFM-3F	5'CTGCCTCTAGCACTGGAAC3'
TUFM-3R	5'CCTAACATTTATCCTGACAAG3'
TUFM-4F	5'GTGAACTGAAGAGCTCGTTG3'
TUFM-5R	5'CGATTATCA AGAGCCACTTCC3'
TUFM-6F	5'GGAAGTGGCTCTTGATAATCG3'
TUFM-7R	5'GAAGGCGAATGTGAGACAGAG3'
TUFM-8F	5'CTCTGTCTCACATTCGCCTTC3'
TUFM-9R	5'GGA ACTATGAGTGAAGCAAAG3'
TUFM-10F	5'GCTGCATTCTCCCATGACTC3'
TUFM-10F	5'CCCTATCCTCTCCAATTTGC3'

ANT1-1FN	5'GCTCCCGGAAGCGCCTTCG3'
ANT1-1RN	5'GCCTGGCGCAGATTTTCCGCG3'
ANT1-2F	5'TAACTAACATGGATAACAGTATCC3'
ANT1-2R	5'TATTA ACTTATGCACATCACCTCC3'
ANT1-3F	5'TGAAGCACCTGCACAGGGGC3'
ANT1-3R	5'CCCTAATAGGATAGTTGAGAACG3'
ANT1-4F	5'GTTACGGAGCCCTCACCAGC3'
ANT1-4R	5'GCTGACTGATACATGAATCATGC3'

TFAM-1F	5'GGCTAGAGGATTGCGGTTTC3'
TFAM-1R	5'CAGAAAGTGAAGGATAGGGTC3'
TFAM-2F	5'GGATACATAGTATCTTGATGAC3'
TFAM-2R	5'GGGTGCTTTCTACACTATACG3'
TFAM-3F	5'GTGGTATGGATTGTGCTTTCC3'
TFAM-3R	5'CCACCCCATACATCCATATTC3'
TFAM-4F	5'GTCTGAAGTCATGCAGTTGC3'
TFAM-4R	5'CTGTTTCATAACTCTGTTCC3'
TFAM-5F	5'CATTCACTTTAAGGAATAATCTG3'
TFAM-5R	5'CCTCCAGAAGAACTTTAATATC3'
TFAM-6F	5'GACAACACATAGATTATACCTG3'
TFAM-6R	5'GTTGTCTTCACATGAATCAAGC3'
TFAM-7F	5'CAAAGAGATAACAGTCTATCTC3'
TFAM-7R	5'GAGTACTCTTCCATAGTCATC3'

AIF -1F	5'GTCTGCGTAATGTGCGTGTG3'
AIF -1R	5'CTCTTGAAGGTCAGGTCGG3'
AIF -2F	5'GCAATAAGTCTTGTACAGTGC3'
AIF -2R	5'CAGTCATTCCAGAATTGGCTC3'
AIF -3F	5'GACATAGAGGA ACTAACATCAG3'

AIF -3R	5'CATTGCTTCTACAAGACATCC3'
AIF -4F	5'GTGGAGGATTGAGACAAGTG3'
AIF -5R	5'GCTGTACCAAGTGTGGACC3'
AIF -6F	5'GAACCACTGATCTGGATACC3'
AIF -6R	5'CCTAGGCTTTGATACTAGTGC3'
AIF -7F	5'CTGAAATCCACAGAATTCCAC3'
AIF -7R	5'GCTTCTGTCTCCTCTCTTGG3'
AIF -8F	5'CCTCATGAGAACTAGAAGAG3'
AIF -8R	5'CTGGAGAAGAGCCATAAATAG3'
AIF -9F	5'GGCTGTCTTATGCCATTGTAG3'
AIF -9R	5'CCAAACACATCTCTGGGATTC3'
AIF -10F	5'CATGCCCCACTGTCCTGTAAG3'
AIF -11R	5'CTCTGGCTCTCATCATTCTG3'
AIF -12F	5'GATTTCTGTTTGAATGACATGG3'
AIF -12R	5'GCCACTAGCTTGACGATGAG3'
AIF -13F	5'CATTACAAGTGTCTTTGAGCC3'
AIF -13R	5'GTCTAACATACGCCAGACAG3'
AIF -14F	5'CAGTGTGATGGAGAATATGTG3'
AIF -14R	5'CCACTGTCTAGGACAGATAC3'
AIF -15F	5'CCTCTAGAAGTAGCTTGAAGC3'
AIF -15R	5'GTTACAGGAATGTTTCTAAGCC3'
AIF -16F	5'GCCTTGGCTCAGGAACATTC3'
AIF -16R	5'CCTTTACCCATTGACCTCC3'

POLG 2F	5'CACAGTGTTGGGGACGCAG3'
POLG 2R	5'TCAGCGCTCCCTACGTGAG3'
POLG 3F	5'CCTTTGGTCTCACTTGTGTC3'
POLG 3R	5'CACAGCTGGTCAACAGATGC3'
POLG 4F	5'GGTCCACACCACCAAGCAG3'
POLG 4R	5'GGGACATGGCAGATCAGCC3'
POLG 6F	5'GTGAGAGCACACTGCCGG3'
POLG 6R	5'GTACCAGGAACACACTGACC3'
POLG 7F	5'CCTGTGGTCATTTATGGCAGC3'
POLG 8R	5'CAATCACAGGACCTTCCCAG3'
POLG 9F	5'TCCTTCGAAAGGATTGCTCC3'
POLG 9R	5'CAGTGTGACTGAATGGCAGC3'
POLG 10F	5'GTCACCAGAAAGCCCCAGG3'
POLG 10R	5'CTGAACCCAGACTCTTGAAC3'
POLG 11F	5'TCAGAGCTGATTCTGAGGAC3'
POLG 11R	5'CAGCCTCCCACCCAAAGG3'

POLG 12F	5'CACCCCAGACTGGCCTGC3'
POLG 12R	5'CTCCAACACGTGTGGGGC3'
POLG 13F	5'ATGGCCCTTGCTGAATGCAG3'
POLG 13R	5'TGGGCCTTGAGCAGAATGAG3'
POLG 14F	5'CTGCTGAGGTTCTGGGCTC3'
POLG 14R	5'CCTCTAGACCATAGTCAGGC3'
POLG 16F	5'GGATGTGGGATAGATTCTGC3'
POLG 16R	5'CCTCAGAGCCCAGTTTCTAC3'
POLG 17F	5'GGCATTCTCTAAAGCCATCC3'
POLG 17R	5'AGGAGTGAGAAAAGCAGCTC3'
POLG 18F	5'GCATGGTGAGCAGGAGCC3'
POLG 18R	5'GAGATAGAACAGATGGGAGTAC3'
POLG 19F	5'GTGATATGTGAACATTCCTTGC3'
POLG 19R	5'AACAGAGGGCAGACTTTGTC3'
POLG 20F	5'CCTGCAGGATCTGCGCAAG3'
POLG 20R	5'CCCCAAGAGAAGCTTCACTC3'
POLG 21F	5'GCTTCTACCCTGGAGTTAATTG3'
POLG 21R	5'CAAGGAACGCTCACCCAAAG3'
POLG 22F	5'CAGGAGTGATGCATCTGTTC3'
POLG 22R	5'GACCCACTTTCTAGTCCACC3'
POLG 23F	5'CACTCTCCTTTTGACCTTAGC3'
POLG 23R	5'TTGGCAGGTCCTGCTACTG3'
<hr/>	
SURF1-3F	5'GCAGTAGTGGAGTCTGTCTTG3'
SURF1-4R	5'CCAGGGCTCTGCTGTTGAAC3'
SURF1-5F	5'CCCTGGTGGGCTGTGTAGTC3'
SURF1-5R	5'ATTAGGGACTTAACTATGCAAGG3'
SURF1-6F	5'CTGAGTGACCATGAGTGACTG3'
SURF1-7R	5'CACAGTAGTGAGTGGGCAATG3'
SURF1-8F	5'GTAAAGGCCATACAGGACTTCC3'
SURF1-9R	5'GATGTAACTTGCATATCAAGTTTGT3'
<hr/>	
SCO2-1F	5'AGGTGAGCAGCTGCAAATGC3'
SCO2-1R	5'GTGAAGCCAAAGTACATCAGC3'
SCO2-2F	5'GGCTGCAGCAGCAAAAGCG3'
SCO2-2R	5'TGGGCCGCTGGTACAGATC3'
<hr/>	
COX10-1F	5'CAGCCAGTCCCTTCCGATC3'
COX10-1R	5'TCCAAGCTACTCCAGAGGTC3'
COX10-2F	5'GTAGCGCTTACCTTAGTGGC3'

COX10-2R	5'TTTGGCCAGGTCGAAATATGC3'
COX10-3F	5'ATGTGATTTCATATAGCACTC3'
COX10-3R	5'CTAAGACAGGACCTGCAGTTC3'
COX10-4F	5'CCTTTACAGTTGGGACTCCTG3'
COX10-4R	5'CTCCTATAGGATATATAGTGTTAC3'
COX10-5F	5'CTGACACCTAGTGCAAATTATTG3'
COX10-5R	5'TGGAAAGTATTGCATTTCCATATC3'
COX10-6F	5'GATGAGTACTGCCTCTACTGG3'
COX10-6R	5'TCGAACCAAGTGCTACAGCTC3'
COX10-7F	5'GACCTTCTGAGGTGCCAGGC3'
COX10-7R	5'TGATCACTGAGCACCGAATTCG3'

COX15-1F	5'CAACGCAGGCGCACTTCTG3'
COX15-1R	5'GGAGCTCCGGAACGTGATG3'
COX15-2F	5'ATGGTACTTCGCGCTAATCAG3'
COX15-2R	5'ACTGATGATCCAAATACCTGAC3'
COX15-3F	5'TAAGTTCAGATCCACTTGTGTGC3'
COX15-3R	5'CATAACTGAACCGAAGTTCAT3'
COX15-4F	5'GTCATCCTGAGGTGTTGATG3'
COX15-4R	5'CCTGGGAGCATTTCTGGTTTC3'
COX15-5F	5'CCTGATAGCTCATTTCTCAG3'
COX15-5R	5'TCAGAGGTAAAGCGACTGGG3'
COX15-6F	5'GAGAATATCTGCCAGGAGTAC3'
COX15-6R	5'CTAGGCCATCTGGATCTAGG3'
COX15-7F	5'GTTTAACTCTGGGATAACAGAC3'
COX15-7R	5'GTTGCCATCAGTGCTTCACTG3'
COX15-8F	5'GGTACAGGAAAGTACTTCATGG3'
COX15-8R	5'CTAGTCTTGAATTCCTGGCTC3'
COX15-9F	5'CATTGTAAGCATATTTGCTTGTG3'
COX15-9R	5'GTTAAGCAGGAAATGGCAGCA3'

1.6.3. Oligonucleótidos y sonda para la cuantificación del número de copias de ADNmt.

Sonda y cebadores del gen 12S ribosomal del ADNmt.

mtF805	5'CCACGGGAAACAGCAGTGATT3'
mtR927	5'CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA3'
sonda 6FAM	5'TGCCAGCCACCGCG3' marcada con FAM™ (Life Technologies)

Sonda y cebadores del gen RNAsaP en el ADN nuclear (*TaqMan RNaseP Control Reagent Kit* (ABI P/N 4304437); Applied Biosystems).

1.6.4. Oligonucleótidos para la cuantificación de niveles de expresión de genes mitocondriales en híbridos.

MT-ATP6F	5'TTTCCCCCTCTATTGATCCC3'
MT-ATP6R	5'TGGGTGGTTGGTGTAAATGA3'
MT-CO1F	5'CTCTTCGTCTGATCCGTCCT3'
MT-CO1R	5'ATTCCGAAGCCTGGTAGGAT3'
MT-RNR1F	5'CGATCAACCTCACCACTCT3'
MT-RNR1R	5'TGCTAAATCCACCTTCGACC3'
MT-CYBF	5'TGAAACTTCGGCTCACTCCT3'
MTCYBR	5'AGAATATTGAGGCGCCATTG3'
MT-ND5F	5'AAACAACCCAGCTCTCCCTAA3'
MT-ND5R	5'AGAAGGATATAATTCCTACG3'
MT-CO2F	5'ACGAGTACACCGACTACGGC3'
MTCO2R	5'CGGGAATTGCATCTGTTTTT3'
MT-CO3F	5'CCCACCAATCACATGCCTAT3'
MT-CO3R	5'GTGGCCTTGGTATGTGCTTT3'

1.6.5. Oligonucleótidos para la cuantificación de los ARNt mitocondriales Valina y Fenilalanina.

tRNA-Val	5'CAGAGCGGTCAAGTTAAGTTG3'
tRNA-Phe	5'GAGGAGGTAAGCTACATAAAC3'

1.6.6. Oligonucleótidos empleados en mutagénesis dirigida y diseño de construcciones plasmídicas.

Tnni3-5	5'CGATACGCGTCAGAAAGACTGCAGTTCAGTGAGGGAC3'
Tnni3-3	5'CCATGGTACCGATGATCTCCAGAGGCAGAGAACAGG3'
Myl3-5	5'GCATACGCGTATGGTGTATAGCATGTGGTACACACTTTTC3'
Myl3-3	5'CCATGGTACCTGGAGCTGTAATCACAAAGAGGAGG3'
Myl3-5cDNA	5'CCTAGGTACCATGGCCCCCAAAAAGCCAGAG3'
Myl3-3cDNA	5'GCATGGGCCCAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAACCAT3'
A571G3'	5'GAGCTCTGCACCCACGACCGTGCCGTTGC3'
A571G5'	5'GCAACGGCACGGTCGTGGGTGCAGAGCTC3'

C296G3'	5'CGAACAGCAGGAAGCCCTCCTTGAACCTTC3'
C296G5'	5'GAAGAGTTCAAGGAGGGCTTCCTGCTGTTG3'
G508T3'	5'GTCCTCGTACGTGCAAGTGTCTTGTCTTG3'
G508T5'	5'CAAGAACAAGGACACTTGCACGTACGAGG3'
5'Cherry KpnI	5'CTCCAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG3'
3'Cherry ApaI	5'GGTTGGAACGGGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCC3'

1.6.7. Oligonucleótidos para la cuantificación de niveles de expresión de genes implicados en miocardiopatías utilizados en cardiomiocitos.

Pgk1 F	5'CTCCGCTTTCATGTAGAGGAAG3'
Pgk1 R	5'GACATCTCCTAGTTTGGACAGTG3'
18S F	5'CCAGTAAGTGCGGGTCATAAGC3'
18S R	5'CCTCACTAAACCATCCAATCGG3'
ACTB FW	5'GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG3'
ACTB RV	5'GCTGATCCACATCTGCTGGAA3'
MyI3F	5'GCGAGCTGAGCCTCTCAGGAAGC3'
MyI3R	5'AGACTACCACACACAGAGTGATC3'
MyI4F	5'CCTGCGTGAGAAAGCAAGAGATC3'
MyI4R	5'TGGGTGAGAGAAGCCATGTGAG3'
Myh6F	5'TGGTCACCAACAACCCATACGACT3'
Myh6R	5'TGGTCACCAACAACCCATACGACT3'
Myh7F	5'AGGAGTACAGCTCTTCTACAGG3'
Myh7R	5'TCTTGCCATTCTCCGTCTCAG3'
Tnni3F	5'CAGGAGATGGAACGAGAGGCAGAA3'
Tnni3R	5'CTCTTCAAAGCCCAGCCCATCCAA3'
Ctf1F	5'GCCTCCAGCTCATAGAGATCCACTT3'
Ctf1R	5'ACAAAGTAAGGGTTACACATA3'
NppaF	5'ATTGACAGGATTGGAGCCCAGAGT3'
NppaR	5'TGACACACCACAAGGGCTTAGGAT3'
Ckmt2F	5'ATGACAAGACATTTCTCATCTGGAT3'
Ckmt2R	5'TCCACGACAGAATCTCTCAAATACG3'
Bcl2F	5'GGGACTTGAAGTGCCATTGGT3'
Bcl2R	5'ATCTCCAGCATCCCACTCGTAG3'

1.7. Reactivos empleados en inmunocitoquímica y Blue Native.

1.7.1. Reactivos y anticuerpos empleados en inmunocitoquímica.

Faloidina TRITC (P-1951; Sigma): tinción de microfilamentos

El anticuerpo policlonal de conejo anti-MYL3 (10913-1-AP; Proteintech): tinción de la cadena ligera esencial de la miosina MYL3

El anticuerpo secundario policlonal de cabra Alexa fluor 647 anti-IgG de conejo (A-21245; Molecular Probes, Life Technologies)

1.7.2. Anticuerpos empleados en Western Blot en geles Blue Native.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-NDUFA9 (MS111; Mitosciences): tinción de la subunidad NDUFA9 del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CII 70KDa (MS204; Mitosciences): tinción de la subunidad SDHA del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CIII CORE2 (MS304; Mitosciences): tinción de la subunidad CORE2 del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-COX5A (MS409; Mitosciences): tinción de la subunidad COX5A del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

El anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de ratón HRP (GAM/IgG (H+L)/PO; Nordic)

2. Pacientes.

2.1. Análisis retrospectivo.

Se revisaron las historias clínicas de 2520 pacientes, de enero del año 2000 a diciembre del 2007, evaluados por sospecha de enfermedad mitocondrial en la unidad de referencia de enfermedades neurometabólicas ubicada en el Hospital 12 de Octubre de Madrid. El criterio clínico de inclusión en este estudio fue la presencia de un fenotipo MCM-plus, es decir, síntomas o signos sugestivos de enfermedad mitocondrial junto con la presencia de afectación cardíaca en forma de miocardiopatía o arritmias. Entre ellos se valoraron fundamentalmente los siguientes: retraso psicomotor, retraso en el desarrollo e hipotonía, en pacientes pediátricos, y encefalomiopatía, síntomas neuromusculares, disfunción gastrointestinal, sordera y atrofia óptica, tanto en pacientes pediátricos como en adultos. Además, en los

pacientes con fenotipo clínico MCM-plus se revisaron también las pruebas complementarias disponibles, sobre todo cardíacas, neurorradiológicas, histológicas, bioquímicas y moleculares.

2.2. Muestras biopsiadas.

Se obtuvieron las muestras de los pacientes de acuerdo con la declaración de Helsinki del año 1975 y revisada en el 2000. El Comité Ético del Hospital 12 de Octubre aprobó este estudio y cada paciente o sus familiares firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Para evaluar la presencia de mutaciones en el genoma mitocondrial o nuclear, se utilizó material genético extraído de biopsias de músculo esquelético previamente almacenadas a -80°C.

Para el proceso de ciberización, en el caso del paciente CM48, se recogió una muestra de sangre del paciente y se aislaron plaquetas por el siguiente proceso: se añadió 0,1 volúmenes de citrato sódico 0,1M y NaCl 0,15M por cada volumen de sangre, se centrifugó a 200g durante 20 minutos a 12°C recogiendo $\frac{3}{4}$ partes del plasma y se centrifugó en un tubo nuevo a 1500g durante 20 minutos a 15 °C. En el caso de los pacientes CM18 y CM68 se utilizaron fibroblastos criopreservados, obtenidos antes de la muerte de los pacientes.

3. Métodos.

3.1. Análisis genético y determinación de haplogrupo.

Se extrajo ADN utilizando procedimientos estándar por el método del fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). Se evaluaron y descartaron, tal como se ha descrito en la literatura científica, la presencia de reorganizaciones a gran escala, depleción del ADNmt y las mutaciones puntuales más frecuentemente descritas en este genoma mitocondrial (DiMauro y Schon, 2003). Posteriormente, el ADNmt completo se amplificó en 24 fragmentos superpuestos de 800-1000 pb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores se diseñaron utilizando la secuencia de referencia de Cambridge revisada del ADNmt humano (Andrews et al., 1999). Los fragmentos de PCR se secuenciaron utilizando un secuenciador A13710 (Applied Biosystems), mediante secuenciación por terminador fluorescente (Applied Biosystems), llevado a cabo por Secugen S.L. Se analizaron las secuencias del ADNmt obtenidas, en busca de nuevas mutaciones, y se clasificaron las muestras en distintos haplogrupos de ADNmt.

3.2. Amplificación y secuenciación de 13 genes nucleares implicados en la función mitocondrial y asociados a MCM.

En los pacientes en los que no se encontraron mutaciones en el ADNmt, se secuenciaron varios genes nucleares. En dichos genes previamente se habían identificado mutaciones, en pacientes diagnosticados de una cardiopatía en el seno de una enfermedad mitocondrial. Estos genes elegidos codifican las subunidades del complejo I NDUFV2, NDUFS2 y NDUFA2 (Loeffen et al., 2001; Bénit et al., 2003); los factores de elongación TSFM, TUFM (J. A. M. Smeitink et al., 2006); el translocador mitocondrial de nucleótidos de adenina ANT1 (Palmieri et al., 2005); el factor de transcripción mitocondrial TFAM (Wang et al., 1999); el factor inductor de apoptosis AIF (Vahsen et al., 2004); la subunidad catalítica de la ADN polimerasa gamma POLG (Verhoeven et al., 2011); y los genes relacionados con el ensamblaje de la citocromo c oxidasa *SURF1*, *SCO2*, *COX10* y *COX15* (Jaksch et al., 2000; Antonicka, Leary, et al., 2003; Antonicka, Mattman, et al., 2003). Se amplificaron los exones y límites intrón/exón de estos genes, utilizando cebadores específicos derivados de las secuencias intrónicas 5' y 3'. Todos los cebadores se diseñaron evitando posiciones inespecíficas y polimórficas.

3.3. Generación de cíbridos transmitocondriales y cultivo celular.

Para homogeneizar los factores nucleares y ambientales, se construyeron cíbridos transmitocondriales utilizando células p^0 de la línea de osteosarcoma 143B 206 resistente a puromicina, con el mismo fondo nuclear. Para este propósito, se fusionaron fibroblastos enucleados o plaquetas de los pacientes, a las células 143B 206 previamente deplecionadas de ADNmt (células p^0). El proceso se realizó como se ha descrito en King M.P. et al, con algunas modificaciones, y se describe en la figura 4 (King y Attardi, 1989). En el caso de utilización de fibroblastos de paciente, se sembraron 5×10^5 células 143B p^0 en una placa de cultivo de 35 mm. Al día siguiente, se procedió a enuclear los fibroblastos mediante centrifugación en presencia de citocalasina B (10 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente, sobre las células enucleadas, se añadieron 1×10^6 células 143B p^0 y el conjunto se incubó durante 3 horas a 37°C y CO_2 al 5% en medio p^0 (DMEM, alta glucosa, piruvato (Gibco, Life Technologies) suplementado con FBS al 10% (Life Technologies); bromodeoxiuridina (BrdU) a 100 $\mu\text{g/mL}$; puromicina a 0,4 $\mu\text{g/mL}$; penicilina a 100 U/mL; estreptomycin a 100 $\mu\text{g/mL}$ y uridina a 50 $\mu\text{g/mL}$). Las células se lavaron con medio mínimo esencial (MEM) (Gibco, Life Technologies) y se trataron durante 1 minuto con polietilenglicol (PEG) al 50% y dimetil sulfoxido (DMSO) al 10%. Se realizaron 3 lavados con MEM-DMSO al 10% y después las células se incubaron 24 horas en medio p^0 . En el caso de fusión con plaquetas de pacientes, se utilizó el siguiente procedimiento: se centrifugaron las plaquetas, a 15°C, en 10 mL de medio (NaCl 0,15 M; Tris-HCl 15 mM pH 7,4 y 10% de FBS) durante 15 minutos y con una velocidad de 1500 g. Se retiró el sobrenadante y se añadieron sobre el pellet las células p^0 , muy cuidadosamente sin removerlo. Este conjunto celular se centrifugó a 180 g

durante 10 minutos a temperatura ambiente y se retiró el medio. Se añadieron 100 μ L de PEG al 42% (Sigma) y se incubó durante 5 minutos. Una vez finalizada la fusión se añadió medio p⁰.

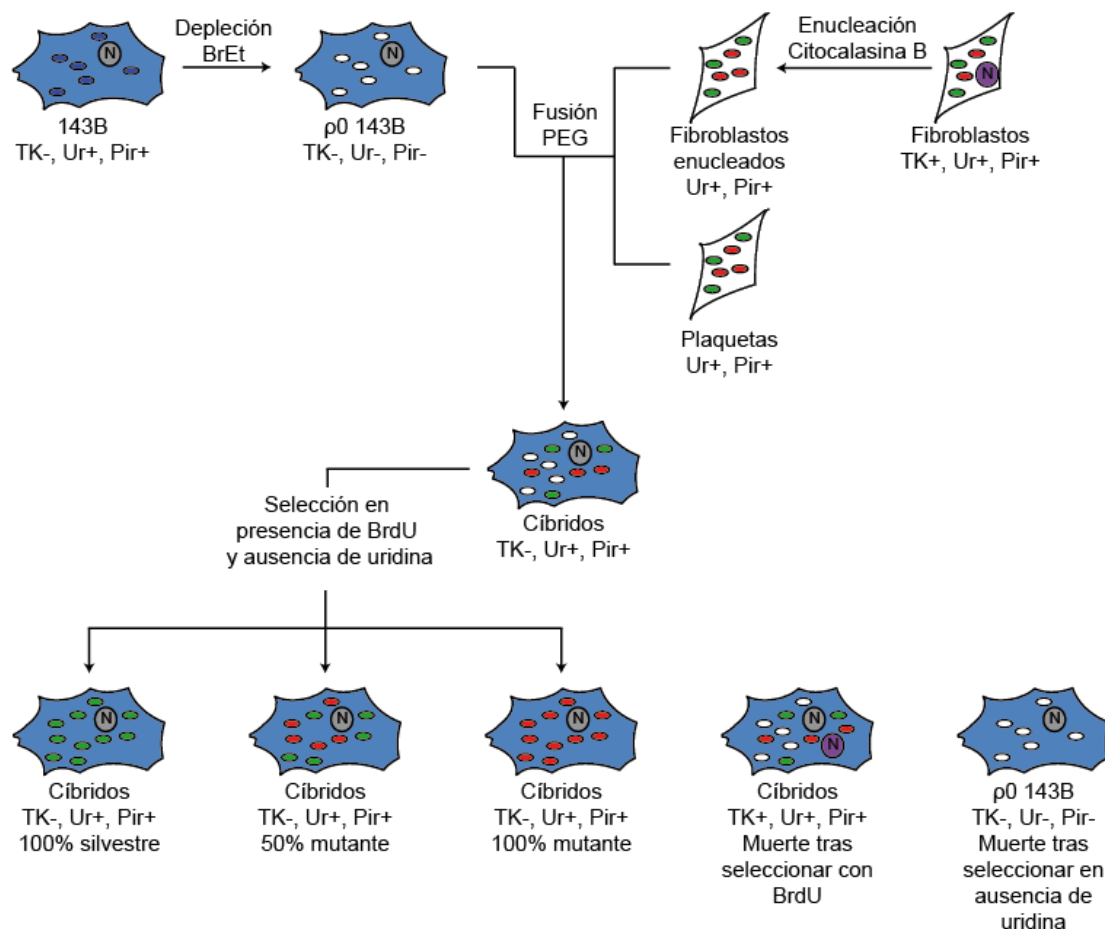


Figura 4. Representación esquemática del proceso de hibridación. Las células p0 se generaron deplecionando el ADNmt en presencia de bromuro de etidio (BrEt) la línea celular 143B TK⁻. En este caso se emplearon plaquetas o fibroblastos enucleados para aportar las mitocondrias con las mutaciones correspondientes y se fusionaron a las células p0 con polietilenglicol (PEG). La posterior selección con bromodeoxiuridina (BrdU) y ausencia de Uridina permite la obtención de híbridos con distintos porcentajes de heteroplasmia para cada mutación. TK⁻: deficiencia del gen de la timidina kinasa; Ur⁻: deficiencia en síntesis de uridina; Pir⁻: deficiencia en síntesis de piruvato.

Los híbridos se crecieron durante 15 días en medio de selección (DMEM, alta glucosa, piruvato (Gibco, Life Technologies) suplementado con FBS dializado al 10% (Life Technologies); BrdU a 100 μ g/mL; puromicina a 0,4 μ g/mL; penicilina a 100 U/mL y estreptomina a 100 μ g/mL).

Tras la selección, los híbridos se cultivaron en medio de híbridos (DMEM, alta glucosa, piruvato (Gibco, Life Technologies) suplementados con FBS al 10% (Life Technologies); puromicina a 0,4 μ g/mL; penicilina a 100 U/mL; estreptomina a 100 μ g/mL y uridina a 50 μ g/mL). Se aislaron clones individuales y se extrajo el ADN para analizar por secuenciación la presencia/ausencia de la mutación mitocondrial correspondiente.

3.4. Cuantificación de niveles de ADNmt en cíbridos transmitocondriales por RT-qPCR.

El ADN se aisló de cíbridos, en células recogidas por tripsinización, mediante el *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de ADNmt se midió por RT-qPCR en multiplex utilizando un Applied Biosystems StepOnePlus System (Applied Biosystems) como se ha descrito previamente (Andreu et al., 2009). Los genes diana fueron el gen 12S ribosomal del ADNmt y el gen RNAsaP del ADN nuclear. La mezcla de reacción se realizó con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNmt en clones celulares transmitocondriales.

El ARN total se aisló de células utilizando el método del Trizol (Life Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se retrotranscribió 1 µg de ARN a ADNc utilizando el *High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems). Los niveles de ARNmt de los genes MT-ND5, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-ATP6 y MT-CYB, se determinaron por triplicado en 3 experimentos independientes, por RT-qPCR, mediante el software StepOnePlus Real-Time PCR System. Los niveles de expresión se normalizaron contra el ARNr 18S y se calculó la cantidad relativa de expresión génica utilizando el método del Ct (ciclo umbral) comparativo (Schmittgen et al., 2008).

3.6. Espectrofotometría de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria (CR) mitocondrial en clones celulares transmitocondriales.

Para la cuantificación de la actividad enzimática de los complejos de la CR, se utilizaron 10×10^6 células como se ha descrito previamente (Tiranti et al., 1995). El pellet se resuspendió en 2 mL de tampón (250 mmol/L sacarosa, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, 100 U/L heparina, pH 7,4) y se sonicó 3 veces en agua fría con hielo durante 10 segundos, con descansos de 30 segundos entre cada vez. Para eliminar los restos celulares, se centrifugó cada muestra y se utilizó el sobrenadante como muestra de reacción para el análisis espectrofotométrico, utilizando el espectrofotómetro DU 800 Spectrophotometer (Beckman Coulter).

La actividad enzimática del complejo I (NADH CoQ oxidoreductasa) se determinó midiendo la oxidación del NADH a 340 nm. El medio de reacción contenía tampón fosfato 20 mM pH=8; NADH 0,2 mM; NaN_3 1 mM; BSA-EDTA 0,1 % y CoQ 200 µM. La reacción fue inhibida al 90 % tras añadir rotenona 5 µM.

La actividad enzimática del complejo II (Succinato deshidrogenasa) se determinó monitorizando la reducción del aceptor artificial de electrones 2,6-Diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm. El medio de reacción contenía succinato 32 mM; tampón fosfato 50 mM pH=7; KCN 1,5 mM; CoQ 50 μ M y DCPIP 0,1 mM.

La actividad enzimática del complejo III (ubiquinona-citocromo C oxidorreductasa) fue valorada según la aparición de citocromo C reducido a 550 nm, en una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato 50 mM pH=7,5; NaN₃ 2 mM; BSA-EDTA 0,1%; citocromo C 1mM y decilubiquinol (DBH2) 50 μ M.

La actividad enzimática del complejo IV (citocromo C oxidasa) se determinó por la oxidación del citocromo C reducido a 550 nm en una solución con tampón fosfato 10 mM pH=7 y citocromo C reducido 80 μ M.

Todas las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 30°C, excepto la del complejo IV que se incubó a 38°C. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular mediante el *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific).

La actividad de la enzima citrato sintasa se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm producida por la reacción de DNTB (ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) 100 μ M con la coenzima A libre, formada por la reacción de la acetil-CoA 350 μ g/mL con el oxalacetato 0,5 mM, en una solución con tampón 75 mM Tris-HCl pH=8 y 0,1% Tritón X-100. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular mediante el *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific).

En este estudio, no se normalizaron las actividades enzimáticas a la actividad de la citrato sintasa, porque esta enzima matriz se expresa también a altos niveles en las células p⁰ sin mitocondrias.

Los datos se representaron en nmoles de producto por minuto⁻¹ por mg de proteína⁻¹ y se calculó la media y el error estándar (n=3). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.7. Electroforesis Blue native en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

Los extractos de proteína mitocondrial se obtuvieron levantando los cíbridos mediante tripsinización y centrifugación. Posteriormente se añadió sobre el pellet de células PBS 1X con 2 mg/mL de digitonina durante 15 minutos a 4°C. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se congeló el pellet hasta su utilización.

Los geles en gradiente de poliacrilamida 3-13% para blue native se cargaron con 60 μ g de extractos de proteína mitocondrial obtenidos. Se siguió el protocolo descrito en detalle por Nijtmans et al., (2002), resumido a continuación: para la electroforesis, se utilizó un tampón para el cátodo (Bis-Tris 15 mM;

Tricina 50 mM; Serva Blue G-250 al 0,02%; pH=7), un tampón para el ánodo (Bis-Tris 50 mM; pH=7) y se electroporó a 30 V durante 30 minutos y posteriormente a 80 V durante 2 horas. Se cambió el tampón para el cátodo, por un tampón similar sin Serva Blue G-250, para desteñir los geles y se continuó la electroporación 3 horas más. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 35 V durante toda la noche y se hibridaron con anticuerpos específicos. Una película (AGFA) se expuso a la membrana en presencia de ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) y se reveló con el instrumento SRX-101A Tabletop Processor (Konica Minolta). El experimento se realizó por triplicado (n=3).

3.8. Curvas de crecimiento realizadas en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

Para la realización de curvas de crecimiento, se sembraron, por quintuplicado, 100.000 células en placas MW6 en medio de glucosa (DMEM, alta glucosa, piruvato (Gibco, Life Technologies) suplementado con FBS al 10% (Life Technologies); puromicina a 0,4 µg/mL; penicilina a 100 U/mL; estreptomina a 100 µg/mL y uridina a 50 µg/mL) y en medio de galactosa (DMEM, sin glucosa (Gibco, Life Technologies), suplementado con FBS dializado al 10% (Life Technologies); puromicina a 0,4 µg/mL; penicilina a 100 U/mL; estreptomina a 100 µg/mL; piruvato de sodio a 0,11 g/L y L-galactosa a 4,5 g/L), como fuentes de carbono. Cada 24 horas se recogieron las células por tripsinización y se contaron en una cámara de Neubauer. Posteriormente, utilizando los datos obtenidos, se calculó el tiempo de duplicación de cada línea celular en ambas condiciones y se calculó la relación galactosa/glucosa.

$$\text{Tiempo de duplicación} = \frac{\text{Ln}(2)}{\text{Pendiente de la curva de crecimiento}}$$

Los datos se representaron en número de células y se calculó la media y el error estándar (n=3). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.9. Cuantificación de ATP en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

Para cuantificar la cantidad de ATP en cíbridos, se analizó el ATP total y el ATP mitocondrial para cada clon celular. Los datos de cuantificación de ATP basales en cíbridos se representaron normalizando la concentración de ATP frente a la cantidad de proteína presente. Para ello, se siguió el protocolo descrito por (McKenzie et al., 2007) con algunas modificaciones. En las 14-16 horas previas al experimento, se sembraron 200.000 células en placas de 35 mm en medio de cíbridos. Transcurrido el tiempo, se lavaron las placas con PBS y se añadieron 2 mL de solución madre (NaCl 156 mM, KCl 3 mM, MgSO₄

Heptahidratado 2mM, KH_2PO_4 1,25 mM, CaCl_2 Dihidratado 2mM y HEPES 20mM) a la que se adicionó glucosa 10 mM, para cuantificar ATP total; y 2-deoxiglucosa 5mM y piruvato sódico 5mM, para cuantificar ATP mitocondrial. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente se retiró la solución madre y se congeló la base de cada placa en una bandeja con etanol y hielo seco. Inmediatamente se añadió 1 mL de solución TE ATP LISIS (Tris 100 mM; EDTA 4 mM) calentado previamente a 90°C. Se rascó con ayuda de un scrapper y se recogió la solución, ya con el ATP, en tubos de 1,5 mL. Se centrifugaron las muestras a 14000 g durante 5 minutos y se dejaron en hielo. La medida de cada muestra se realizó mediante *ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, en un luminómetro Glomax 96 Microplate Luminometer (Promega).

Paralelamente se obtuvo una muestra de proteína para cada experimento reservando una placa p35. Cada placa se lavó con PBS 1X, se añadieron 200 μL de RIPA (Tris-HCl 50 mM pH=8; NaCl 150 mM; DOC 0,5 %; IGEPAL CA-630 1% y SDS 0,1 %) y se incubó a 4°C durante 10 minutos. Cada muestra obtenida se centrifugó a 14000 g durante 5 minutos. La medida de proteína se realizó mediante *Micro BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific).

Los datos se representaron en pmoles de ATP por μg de proteína⁻¹ y se calculó la media y el error estándar (n=9). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.10. Medida del consumo de O_2 por respirometría en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

El consumo de oxígeno mitocondrial se determinó mediante técnicas de respirometría de alta resolución (Oxígrafo-2k, Oroboros Instruments). El día de la medida, las células se tripsinizaron y se contaron utilizando una cámara de Neubauer. Las células se resuspendieron en 2mL de DMEM alta glucosa, sin glutamina, ni metionina, ni cisteína (Gibco, Life Technologies) a una concentración de 5×10^5 células/mL. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C y en agitación constante de 750 rpm.

Se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial de los cíbridos en estado basal, para ello, se añadió, a los 2 mL de medio con las células en suspensión, 1 μL de oligomicina (4 mg/mL), y 1 μL del agente desacoplante FCCP (1 mM) en sucesivos pasos hasta alcanzar el máximo desacoplamiento, donde se puede determinar la respiración máxima. Se abrieron las cámaras del oxígrafo para reoxigenar y, posteriormente, se añadieron 10 μL de rotenona (0,1 mM) para inhibir el complejo I y 1 μL de Antimicina A (5 mM) para inhibir el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Tras bloquear la cadena respiratoria mitocondrial, el consumo restante, consumo de oxígeno no mitocondrial, se empleó para normalizar los datos obtenidos anteriormente.

Los datos se representaron en pmoles de O₂ por segundo⁻¹ por millón de células⁻¹ y se calculó la media y el error estándar (n=4). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.11. Cuantificación del ARNt mitocondrial mediante northern blot.

Para determinar la cantidad de ARNt-val mitocondrial, se cuantificó mediante técnicas de northern blot, descritas previamente (Bornstein et al., 2005). Brevemente, el ARN total (5 µg) extraído de cíbridos, por el método del Trizol (Life Technologies), fue incubado a 90°C durante 5 minutos, y resuspendido en tampón de carga 4X (70% de TBE-urea 7 M; 30% glicerol; y azul de bromofenol). Se electroporó a través de un gel al 12% en poliacrilamida TBE- urea 7 M, a 60 V y se transfirió a una membrana Zeta-probe a 300 mA durante 30 minutos, en tampón TBE.

Para fijar el ARN a la membrana, se utilizó el protocolo Optimal Crosslink en un Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corporation). La membrana fue prehibridada durante una hora a 42°C. A continuación, la hibridación se realizó a 42°C durante 24 h en tampón Z (7% SDS; 79 mM NaH₂PO₄; 170 mM Na₂HPO₄). El ARNt-val fue detectado utilizando 8 pmoles de un oligonucleótido sintético correspondiente al gen MT-TV, marcado con 8,3 pmoles de 25 µCi ATP [γ -³²P] en su terminación 5'. El marcaje de los oligonucleótidos se realizó mediante el uso de T4 polinucleótido kinasa (Promega) y se purificó mediante el uso de PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare) según las instrucciones de cada fabricante.

Tras la hibridación en tampón Z, la membrana se lavó 3 veces en solución de lavado 1 (4X SSC; 0,5% SDS) y una vez en solución de lavado 2 (0,1X SSC; 0,5% SDS) a 42°C. Una película (AGFA) se expuso a la membrana y se reveló con el instrumento SRX-101A Tabletop Processor (Konica Minolta). La membrana se desnudó, hirviéndola durante 1 hora en solución de lavado 2 y se rehibridó bajo las mismas condiciones con un oligonucleótido específico de 21 nucleótidos de longitud correspondiente al gen MT-TF, marcado con ATP [γ -³²P] en su terminación 5', para detectar el ARNt-phe. La relación entre ARNt-val y ARNt-phe se calculó cuantificando las respectivas señales por densitometría de bandas mediante el software TotalLab Quant (TotalLab).

Los datos se representaron relativizados frente a uno de los controles y se calculó la media y el error estándar (n=3). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.12. Cuantificación de ROS por citometría en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

Para determinar las especies reactivas del oxígeno (ROS), se sembraron 75.000 células para cada clon celular, en pocillos de placas MW12, en medio glucosa/galactosa (DMEM, *no glucose* (Gibco, Life

Technologies); suplementado con FBS dializado al 10% (Life Technologies); puromicina a 0,4 $\mu\text{g/mL}$; penicilina a 100 U/mL; estreptomicina a 100 $\mu\text{g/mL}$; piruvato de sodio a 0,11 g/L; L-Galactosa a 2,5g/L y Glucosa a 2 g/L), y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante las 12 horas previas al experimento. Se determinó la cantidad de ROS mediante la detección del fluoróforo diclorofluoresceína diacético (DCFH). Para ello, se retiró el medio, se añadió medio con DCFH 10 μM y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se levantaron por tripsinización y se pasaron a una placa MW96. Las células se mantuvieron en oscuridad y a 4 °C hasta que se analizaron en un citómetro Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter).

Paralelamente, se realizó un blanco para cada clon celular siguiendo el mismo procedimiento en ausencia de DCFH. También se realizó un control positivo para verificar la detección de ROS siguiendo el mismo procedimiento, con el paso añadido de crecer las células en medio sin FBS, la hora previa a la incubación con DCFH.

Los datos se representaron en unidades arbitrarias de fluorescencia de la mediana de cada clon para cada experimento, obtenidas del citómetro. Se calculó la media y el error estándar (n=4) y se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.13. Cuantificación del nº de células, tras inducción de apoptosis y mediante citometría, en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

Para la determinación de la sensibilidad de los clones a la apoptosis, se sembraron 75.000 células por pocillo en placas MW12, en medio de cíbridos, el día anterior al ensayo. Transcurridas 24 horas se indujo la apoptosis, añadiendo medio de cíbridos, con estaurosporina 33,3 μM , durante 24 horas más, para obtener un nivel de apoptosis aproximado del 25%. Paralelamente se llevó un control negativo, sin estaurosporina, para ver el índice de muerte celular de los cíbridos sin el tratamiento. Se determinó la apoptosis temprana, tardía, la despolarización y la necrosis, para ello se utilizaron los siguientes reactivos: yoduro de propidio, con capacidad de unirse al ADN de células necróticas y en apoptosis tardía; FITC-Anexina V, capaz de unirse a la fosfatidilserina de la bicapa lipídica interna, cuando se encuentra en la bicapa lipídica externa (células apoptóticas); y Mitostep (DiIC1(5)) capaz de revelar la despolarización mitocondrial, acumulándose en mitocondrias con el potencial de membrana activo. Para ello se utilizó el *Apoptosis Detection Kit* (Immunostep) Siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez se incubaron las células con los diferentes fluoróforos, se mantuvieron a 4 °C en oscuridad hasta su análisis por citometría en un Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter)

Los datos se representaron en porcentaje de células positivas para cada fluoróforo y se calculó la media y el error estándar (n=3). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.14. Cuantificación de lactato en clones celulares de cíbridos transmitocondriales.

La cuantificación de lactato producido en cíbridos se realizó mediante la obtención de muestras de medio en el que crecieron los cíbridos y se normalizó frente a la cantidad de proteína de los distintos cíbridos. La medida de lactato se basa en la reacción enzimática de la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), de la que se obtiene NADH y es detectable a una absorbancia de 340 nm. Para ello se sembraron 100.000 células, de cada clon de cíbrido, a analizar, en pocillos de placas MW6 y se crecieron en medio de cultivo de cíbridos. Tras 24 horas, los cíbridos se incubaron con medio glucosa/galactosa y tras 48 horas se recogió el sobrenadante. Se añadieron 2 volúmenes de Perclórico 8%/EtOH 40%, se mantuvo el medio a 4°C durante 10 minutos y se centrifugó a 20.000 g, 10 minutos a 4°C. El lactato se midió directamente del sobrenadante, basándose en la reacción anteriormente descrita. La reacción se llevó a cabo al añadir 15 µL del sobrenadante obtenido de cada muestra; 150 µL de Tampón de ensayo (0,5 M glicina pH 9,5; 0,2 M hidracina y 3,4 mM EDTA); 100 µL de H₂O mQ; 30 µL de NAD⁺ (15 mM) (Roche) y 5 µL de L-LDH (Roche), diluida previamente a 1100 U/mL, en un tampón de dilución (Hepes 50 mM pH 7,2; KCl 100 mM). Las reacciones se incubaron durante 2 horas a 37 °C, en una placa MW96, y se tomaron los datos de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm en un lector de placas Synergy HT (Biotek). Los datos se obtuvieron en referencia a una recta patrón con distintas concentraciones conocidas de L-Lactato de sodio (Sigma) de 0 a 4 mM.

Paralelamente se obtuvo una muestra de proteína de cada experimento. Cada placa se lavó con PBS 1X, se añadieron 200 µL de RIPA (Tris-HCl 50 mM pH=8; NaCl 150 mM; DOC 0,5%; IGEPAL CA-630 1% y SDS 0,1 %) en cada pocillo y se incubó a 4°C durante 10 minutos. Cada muestra obtenida se centrifugó a 14000 g durante 5 minutos. La medida de proteína se realizó mediante *Micro BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los datos se representaron en µmoles de lactato por mg de proteína⁻¹ y se calculó la media y el error estándar (n=3). Se realizó una prueba t de Student para determinar la significación estadística.

3.15. Diseño y construcciones plasmídicas.

Con el fin de desarrollar líneas celulares que nos permitan analizar la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas, se realizaron varias construcciones plasmídicas que posteriormente se transfectaron en la línea celular AMPIGX7.

El diseño de los plásmidos se realizó con los programas Vector NTI (Invitrogen) y ApE (A plasmid editor).

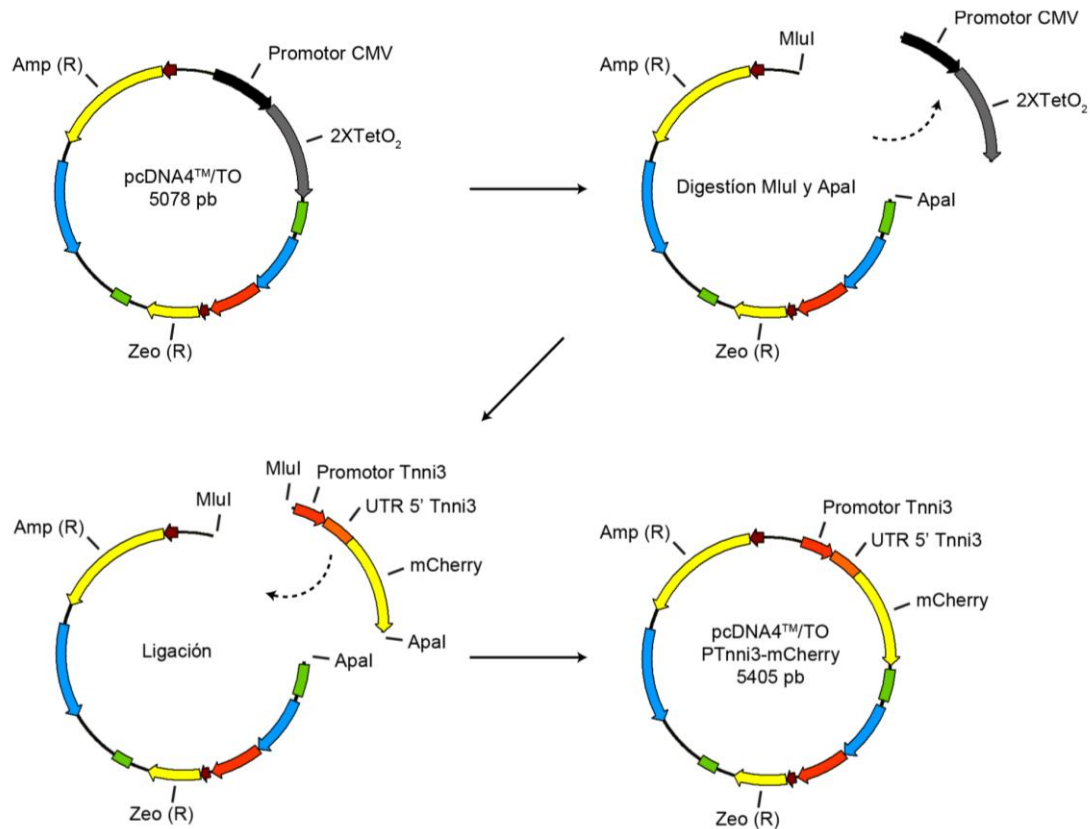


Figura 5. Representación esquemática del método experimental empleado para realizar las construcciones plasmídicas, a partir de un *pcDNA4™/TO*. Se describe la eliminación del promotor CMV y los sitios de unión a tetraciclina 2xTetO₂ por digestión y la inserción del fragmento con el promotor elegido seguido del gen de la proteína elegida mediante ligación. En este caso se representa la inserción del promotor de *Tnni3* seguido del gen *mCherry*.

Se amplificaron por PCR los promotores de los genes *Tnni3* y *Myl3* de una biblioteca de ADN genómico de ratón con los cebadores *Tnni3*-5, *Tnni3*-3, *Myl3*-5 y *Myl3*-3 añadiendo las dianas para las enzimas de restricción *MluI* en el extremo 5' y *KpnI* en el extremo 3'. El gen *Myl3* se amplificó por PCR de una biblioteca de ADNc de corazón de embrión de ratón, con los cebadores *Myl3*-5cDNA y *Myl3*-3cDNA, añadiendo las dianas para las enzimas de restricción *KpnI* en el extremo 5' y *Apal* en el extremo 3'. Posteriormente se añadieron mutaciones al fragmento de ADNc de *Myl3* amplificando por PCR con los cebadores *Myl3*-5cDNA, *Myl3*-3cDNA, A571G3', A571G5', C296G3', C296G5', G508T3' y G508T5'. Se obtuvieron cuatro tipos distintos de ADNc del gen *Myl3*: mutación c.571A>G (p.Met149Val); mutación c.296C>G (p.Ala57Gly); mutación c.508G>T (p.Gly128Cys) y la isoforma silvestre, como control.

Los 4 ADNc de *Myl3* y los fragmentos de los promotores de *Tnni3* y *Myl3* se clonaron por separado con el *TOPO TA Cloning kit* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los clones obtenidos se secuenciaron y subclonaron en un vector *pcDNA4/TO* (Life Technologies) con resistencia a zeocina. Se obtuvieron 8 plásmidos: 4 con el promotor de *Tnni3* y 4 con el promotor de *Myl3*. Se construyeron 2 plásmidos más con los promotores de *Tnni3* y *Myl3* seguidos del gen *mCherry* (Figura 5), para evaluar la

eficacia de dichos promotores, mediante el análisis de la medida de fluorescencia por microscopía confocal.

3.16. Establecimiento de líneas celulares ES y mantenimiento en cultivo celulares.

Para poder analizar el efecto de distintas mutaciones de *My/3* en cardiomiocitos, se utilizó la línea de células ES de ratón AMPIGX7 generada por A. Sanchinidis (Akasha et al., 2008), con capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos mediante la generación de cuerpos embrioides (EBs). Esta línea celular presenta un promotor del gen *Myh6* seguido de un gen de resistencia a puromicina y el gen *eGFP*, que permite el aislamiento de cardiomiocitos para su estudio. La aproximación experimental se detalla en la figura 6.

Las células ES se crecieron en adherencia en frascos T25 con tapones ventilados, tratados con gelatina 0,2% durante al menos 3 horas, y con medio de propagación (GMEM BHK-21 (Gibco, Life Technologies) suplementado con FBS inactivado por calor al 10% (Gibco, Life Technologies); LIF 100 U/mL (ESGRO, Chemicon); β -2mercaptoethanol 50 μ M (Life Technologies); 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin). El medio de propagación se cambió todos los días y las células se pasaron a un nuevo frasco cuando alcanzaron un 70-80 % de confluencia.

Los distintos plásmidos se transfectaron en 3×10^6 células mediante electroporación a 490 μ F y 240 V y se sembraron en placas. Tras 24 horas se añadió medio de propagación con zeocina (100 μ g/mL). Las células se mantuvieron en cultivo 11 días con tratamiento en zeocina. Se cambió el medio de propagación con zeocina cada día y se realizaron pases, primero a los 3 días y después cada 2 días. Se seleccionaron clones celulares, de las líneas con las distintas isoformas de MYL3, con diluciones límite, aislando células individuales en pocillos de placas MW96. Se realizaron pases de cada clon, cada 3 días como máximo, en pocillos de placas MW96 hasta llenarse y se sembraron en placas de MW 24 y MW6. Los pases se realizaron con un máximo de 3 días para evitar diferenciación.

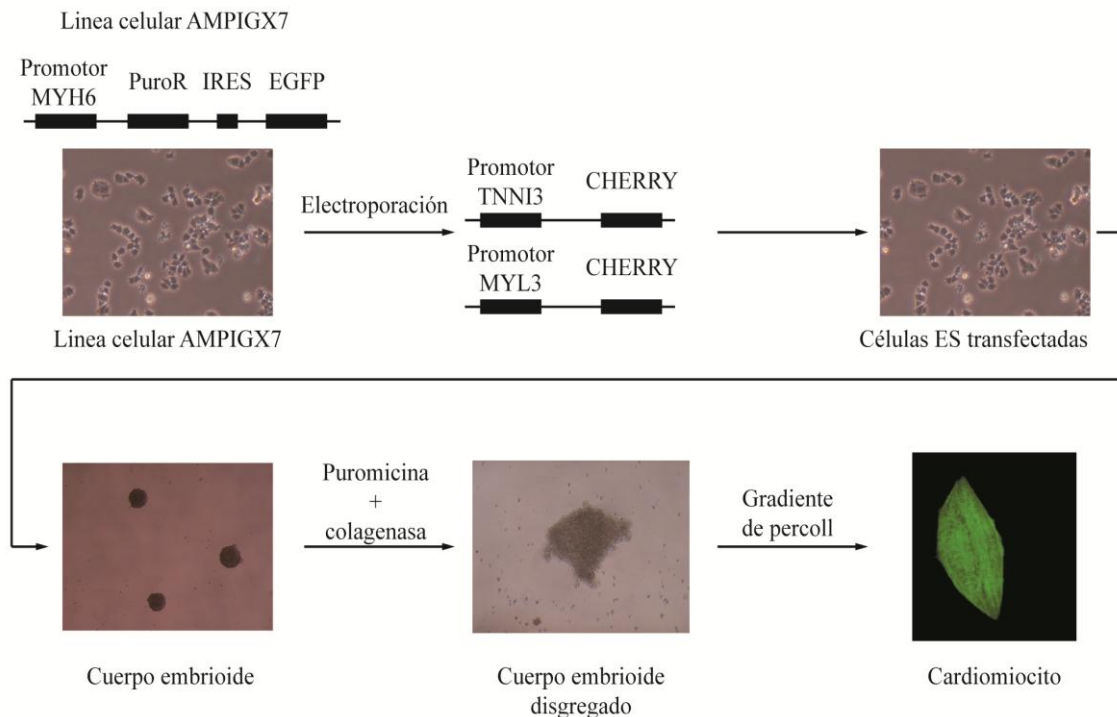


Figura 6. Representación esquemática del método de obtención de cardiomiocitos a partir de células ES. Se observa la electroporación de los plásmidos con los distintos promotores seguidos de la expresión del gen *mCherry*, la diferenciación mediante la generación de cuerpos embrioides, la disgregación con colagenasa y la purificación mediante puromicina o mediante gradientes discontinuos de percoll. El mismo proceso de electroporación se empleó para los plásmidos con el promotor de *Tnni3* seguido de las distintas isoformas de *Myl3*.

3.17. Diferenciación de células ES a cardiomiocitos, disgregación de cuerpos embrioides (EBs) y cultivo de cardiomiocitos.

Para la diferenciación de las células ES se siguió el protocolo de diferenciación descrito por Akasha et al. 2008 con algunas modificaciones resumidas a continuación: las células ES se resuspendieron en medio de diferenciación (IMDM (Gibco, Life Technologies) suplementado con FBS inactivado por calor al 10 % (Gibco, Life Technologies); MEM 1X (Life Technologies); β -2mercaptoethanol 100 μ M (Life Technologies); 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina). Se generaron cuerpos embrioides (EBs) por el método de gotas colgantes o *hanging drops* de manera que hubiera 500 células en cada gota de 20 μ L durante 2 días. Los EBs se pasaron de las gotas a placas P100 y se mantuvieron en suspensión. Transcurridos 3 días, se cambió el medio de diferenciación por el mismo medio suplementado con ácido ascórbico 1 μ M, y se mantuvieron en suspensión durante 4 días más. Los EBs se mantuvieron en suspensión 7 días en total, momento en el que se pudieron observar áreas contráctiles (Video 1).

Una vez detectadas las áreas contráctiles, los cardiomiocitos se seleccionaron mediante tratamiento con puromicina o mediante gradientes discontinuos de percoll. En el caso de selección con puromicina, los EBs se mantuvieron en suspensión y se trataron con puromicina 2 μ g/mL. Tras 4 días de tratamiento, se disgregaron las colonias con colagenasa B (Roche) 0,1% durante 1 hora y con tripsina durante 5 minutos.

Se sembraron las células y se obtuvieron cardiomiocitos purificados. En el caso de la selección por gradientes discontinuos de percoll se siguió el protocolo descrito por (E et al., 2006) explicado a continuación: el gradiente, realizado en un tubo de centrifuga de 15 mL, consistió en una capa de 3 mL de Percoll al 40,5 % en Hepes 0,2M NaCl 0,15 M, sobre una capa de 3 mL de Percoll al 58,5 % en Hepes 0,2M, NaCl 0,15 M. Los EBs se disgregaron con colagenasa B al 0,1 % durante 1 hora y con tripsina durante 5 minutos, se centrifugaron a 200 g y se resuspendieron en PBS 1X EDTA 5 mM BSA 0,2%. Las células resuspendidas se añadieron con cuidado sobre las capas del gradiente discontinuo de percoll y se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos. Finalmente, se recolectaron las células de la interfase entre las capas de Percoll al 40,5% y Percoll al 58,5%, y se realizaron 2 lavados en PBS 1X por centrifugación a 200 g.

Los cardiomiocitos purificados se sembraron en placas con cubreobjetos tratados con fibronectina (2 µg/mL en PBS 1X, durante 24 horas) para inmunocitofluorescencia, o se conservaron en Trizol (Life Technologies) para análisis por RT-qPCR.

El video 1, en el que se muestran las áreas contráctiles, se tomó en un microscopio invertido Cell Observer (Zeiss)

3.18. Análisis de la estructura del sarcómero cardíaco por inmunocitoquímica.

Los cardiomiocitos se sembraron sobre cubreobjetos y 48 horas después se fijaron con paraformaldehído al 3,7% durante 15 minutos. Se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% 10 minutos, y se bloqueó con BSA 1% y suero de cabra al 5% durante 40 minutos. Los cubreobjetos, se incubaron con faloidina TRITC 1:200 y Dapi 1:2000 durante 1 hora. El anticuerpo policlonal de conejo anti-MYL3 se utilizó a una concentración 1:100, y Como anticuerpo secundario se utilizó el policlonal de cabra Alexa fluor 647 anti-IgG de conejo 1:1000. Todas las incubaciones de anticuerpo se realizaron durante 1 hora y tras cada incubación se realizaron 3 lavados en PBS 1X de 10 minutos. Las preparaciones se montaron con mowiol (Fluka) y se analizaron con un microscopio confocal LSM710 (Zeiss).

3.19. Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm en cardiomiocitos.

Para realizar el análisis de PCR se extrajo ARN de cardiomiocitos, derivados de las líneas ES con las distintas isoformas de MYL3 y la línea ES AMPIGX7. El procedimiento de extracción de ARN se realizó con Trizol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diseñaron cebadores para analizar la expresión de distintos genes en los cardiomiocitos. Los distintos genes analizados son Pgc1, 18S y Actb como controles endógenos; los genes que codifican proteínas sarcoméricas Myl3, Myl4, Myh6, Myh7 y Tnni3; el gen Bcl2 implicado en procesos apoptóticos; el gen Ckmt2 implicado en el

metabolismo celular; y los genes *Nppa* y *Ctf1* implicados en el desarrollo cardiaco. Se cargaron 5ng de cada muestra en un total de 10 μ L de reacción, en placas MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems), y se utilizó Power SyBr Green (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante, con los distintos cebadores. Los datos se analizaron mediante cuantificación relativa, con los programas SDS y Microsoft EXCEL, utilizando el método del Ct comparativo.

Resultados

1. Evaluación retrospectiva de las historias clínicas de los pacientes con fenotipo clínico MCM-plus.

1.1. Cuadro clínico.

De las 2.520 historias clínicas revisadas de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, únicamente evidenciamos en 127 pacientes una disfunción cardíaca acompañante. De éstos, seleccionamos aquellos que presentaban un fenotipo clínico MCM-plus, es decir, miocardiopatías acompañada de síntomas o signos de disfunción mitocondrial, siendo 71 los únicos que cumplían este requisito clínico. Sin embargo, solo pudimos recuperar 45 muestras de biopsias de músculo esquelético congeladas para poder extraer material genético y llevar a cabo los análisis moleculares correspondientes.

En esa cohorte de 45 pacientes, 24 varones (53,3%) y 21 mujeres (46,7%), la frecuencia del fenotipo MCM-plus estuvo especialmente representada entre los niños menores de 10 años de edad (Tabla 1). Con respecto a la procedencia poblacional de los pacientes, 42 (93,3%) eran de origen europeo y 3 (6,7%) de origen magrebí. La tasa de mortalidad en la serie estudiada fue del 20%. Teniendo en cuenta solo pacientes pediátricos, observamos una tasa de mortalidad más elevada, dado que el 88,9% de las muertes en nuestros pacientes ocurrieron antes de los 2 años de edad. Tras una evaluación básica de la función cardíaca mediante ecocardiograma y ECG, se diagnosticó miocardiopatía dilatada (MCD) en 13 pacientes (28,9%), miocardiopatía hipertrófica en 21 pacientes (46,7%), miocardiopatía restrictiva en un paciente (2,2%) y en 10 pacientes (22,2%) no quedaba constancia del subtipo de miocardiopatía, en la historia clínica de cada uno de ellos y no podíamos acceder a esa información cardiológica. Sin embargo, debido a que estos 10 pacientes presentaban fenotipo clínico MCM-plus, todos ellos fueron incluidos en este estudio. En estos 45 pacientes diagnosticados de MCM-plus, se observaron síntomas y signos no cardíacos relacionados con una disfunción mitocondrial, con más de un órgano involucrado en algunos de ellos. Las manifestaciones clínicas no cardíacas que presentaban estos pacientes fueron retraso psicomotor, retraso en el desarrollo, dismorfia, hipotonía, debilidad muscular o miopatía, ptosis u oftalmoplejía, disfunción pulmonar, disfunción renal, sordera, atrofia óptica, lipomas, acidemia láctica y síntomas neurológicos y gastrointestinales (Tabla 1).

Características clínicas de pacientes con MCM-plus (n=45)	
	Pacientes n (% total)
Edad de presentación de MCM (rango: 0-56 años)	
0-10	28 (62,2)
11-20	6 (13,3)
21-30	3 (6,7)
31-40	2 (4,45)
41-50	4 (8,9)
>50	2 (4,45)
Síntomas/signos[†] no cardíacos	
Retraso psicomotor	10 (22,2)
Retraso en el desarrollo	6 (13,3)
Dismorfia	8 (17,8)
Hipotonía	7 (15,6)
Neurológicos	21 (46,7)
Debilidad muscular o miopatía	11 (24,4)
Ptosia/oftalmoplejía	2 (4,4)
Disfunción pulmonar	6 (13,3)
Gastrointestinales	5 (11,1)
Disfunción renal	2 (4,4)
Sordera	3 (6,7)
Atrofia óptica	1 (2,2)
Lipomas	1 (2,2)
Acidemia láctica	3 (6,7)

Tabla 1. Edad de presentación y síntomas y signos de disfunción mitocondrial acompañantes en los pacientes con sospecha de miocardiopatía mitocondrial (MCM). Datos expresados en número de pacientes y porcentaje del total de pacientes. [†]En el mismo paciente puede estar afectado más de un tejido u órgano.

1.2. Análisis histológico y bioquímico en biopsias de músculo esquelético.

En las historias clínicas también revisamos los datos analíticos que se habían realizado en la biopsia de músculo esquelético extraída en su momento a los pacientes incluidos en este estudio. Desde el punto de vista histológico, revisamos si el patólogo había observado la presencia de fibras rojas rasgadas y/o depósitos oxidativos subsarcolémicos. También registramos los resultados bioquímicos que se habían obtenido, fundamentalmente de la actividad enzimática de los diferentes complejos de la CR mitocondrial que se habían realizado en homogenado de músculo esquelético. La muerte prematura o la ausencia de muestra en 8 pacientes pediátricos impidieron la obtención de estos resultados. Los datos revisados mostraron que un 46,7% de los pacientes presentaban alguna anomalía tras el análisis histoquímico y un 26,7% presentaban alguna disminución en la actividad enzimática de alguno de los complejos de la CR mitocondrial (Tabla 2).

Características histoquímicas y bioquímicas de pacientes con MCM-plus (n=45)	
	Pacientes n (% total)
Biopsia muscular	
No disponible	8 (17,8)
Normal	16 (35,6)
Depósitos oxidativos subsarcolémicos	10 (22,2)
Fibras rojas rasgadas	11 (24,4)
Deficiencia en la CRM	
No disponible	8 (17,8)
Normal	25 (55,6)
Elevada Citrato sintasa	3 (6,7)
Complejo I	4 (8,9)
Complejo IV	2 (4,4)
Complejo I/IV	1 (2,2)
Complejos III/IV	1 (2,2)
Complejos I/III/IV	1 (2,2)

Tabla 2. Alteraciones histológicas en biopsias musculares y deficiencias en la actividad enzimática de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). Datos expresados en número de pacientes y en porcentaje del total de pacientes.

2. Análisis molecular en material genético extraído de las biopsias musculares.

2.1. Secuenciación del genoma mitocondrial.

Como se ha señalado anteriormente, recuperamos la biopsia de músculo esquelético congelado de sólo 45 de los 71 pacientes con fenotipo clínico MCM-plus. Secuenciamos el genoma mitocondrial completo en el ADN extraído de esas muestras recuperadas y comparamos estas secuencias mitocondriales con la que se acepta universalmente como de referencia (Anderson et al., 1981); así, en 9 pacientes pudimos identificar diversas variantes nucleotídicas (Tabla 3). El análisis de haplogrupos mitocondriales mostraba que todos los pacientes eran de origen europeo excepto uno que era de origen africano (Tabla 3). Evaluamos el nivel de heteroplasmia de las variantes nucleotídicas identificadas y todas ellas se encontraban en homoplasmia excepto una heteroplásmica previamente descrita por nuestro grupo e identificada en el gen *MT-CO2* (m.7896G>A; p.Trp104Stop) (Campos et al., 2001). Esta última mutación no fue detectada ni en la sangre de la madre ni en la hermana de este paciente (Campos et al., 2001). Con respecto a las mutaciones homoplásmicas, no pudimos obtener muestras de los diferentes familiares para chequear la presencia de la variante nucleotídica correspondiente en cada uno de ellos.

Perfil y variaciones de secuencia en el ADNmt en pacientes con MCM-plus (n=45)						
Paciente	Edad inicial (años)	Género	BM	CR	ECG	Eco
CM18	2	F	N	N	N	HVI
CM19	13	F	N	N	N	MCD, ↓FEVI, trasplante
CM39	32	M	N	CI, CIV	Ritmo sinusal, bloqueo incompleto de rama izquierda	Cardiomegalia, HVI
CM47	12	F	N	CI, CIII	N	MCR, ↓FEVI
CM48	14	M	N	CI	Bloqueo incompleto de rama derecha	MCH
CM53	0,3	M	ND	ND	N	MCD, ↓FEVI
CM55	42	F	RRF	CI	N	MCD, ↓FEVI
CM68	2	F	ND	CIV	Repolarización anormal	HVI
CM74	0,2	M	ND	CI, CIV	ND	MCD

Paciente	Síntomas y signos extracardíacos	Variación de secuencia	Gen afectado	Haplogrupo
CM18	Convulsiones, hipotonía, anemia	m.9448A>G ^a (p.Tyr81Cys)	MT-CO3	K
CM19	Déficit cognitivo, habla lenta, dispraxia, laxitud ligamentosa	m-1291T>C ^b	MT-RNR1	V
CM39	Dismotilidad gastrointestinal, caquexia, marcha en tandem, neuropatía sensorial, encefalopatía	m.1644G>A ^{bc}	MT-TV	X
CM47	Retraso psicomotor, dificultad de aprendizaje, hemiplejía izquierda	m.12923G>T ^d (p.Trp196Leu)	MT-ND5	W
CM48	Corta estatura, PEO, retinitis pigmentaria, atrofia muscular	m.1628C>T ^{fb}	MT-TV	L
CM53	Fallo renal, hipotonía, atrofia muscular	m.8519G>A ^d (p.Glu52Lys)	MT-ATP8	I
CM55	Déficit cognitivo, sordera, DM	m.3243A>G ^c	MT-TL1	ND
CM68	Retraso psicomotor, corta estatura, microcefalia, hipotonía	m.7896G>A ^c (p.Trp104Stop)	MT-CO2	ND
CM74	Hipotonía, coma	m.3721A>G ^b (p.Thr139Ala)	MT-ND1	J

Tabla 3. Resumen obtenido de las historias clínicas de cada paciente junto con las variaciones de secuencia encontradas en el ADNmt. ^aPolimorfismo; ^bprobable mutación patogénica; ^cmutación patogénica; ^dprobable polimorfismo. BM, biopsia muscular; RC, cadena respiratoria; ECG, electrocardiograma; Eco, ecocardiograma; N, normal; ND, No determinado; F, femenino; M, masculino; RRF, fibras rojas rasgadas; CI, deficiencia de actividad enzimática en el complejo I; CIII, deficiencia de actividad enzimática en el complejo III; CIV, deficiencia de actividad enzimática en el complejo IV; HVI, hipertrofia del ventrículo izquierdo; MCD, miocardiopatía dilatada; FEVI, fracción de eyección ventricular izquierda; MCR, miocardiopatía restrictiva; MCH, miocardiopatía hipertrófica; PEO, oftalmoplejía externa progresiva; y DM, diabetes mellitus.

2.2. Secuenciación de genes nucleares

Se examinaron 13 genes nucleares en los 39 pacientes restantes en los que no se encontraron mutaciones patogénicas en el ADNmt. Estos genes candidatos se eligieron por estar descritos previamente en la literatura científica como relacionados con la aparición de una miocardiopatía mitocondrial, siendo codificantes de subunidades del complejo I (NDUFV2, NDUF2, NDUF2) (Loeffen et al., 2001; Bénit et al., 2003; Hoefs et al., 2008), de proteínas accesorias del complejo IV (SURF1, SCO2, COX10 y COX15) (Antonicka, Leary, et al., 2003; Antonicka, Mattman, et al., 2003), de factores de elongación mitocondriales (TSFM, TUFM) (J. A. M. Smeitink et al., 2006), y de las proteínas mitocondriales ANT1, AIF, TFAM y POLG (Vahsen et al., 2004; Palmieri et al., 2005; Tavi et al., 2005; Verhoeven et al., 2011). Sin embargo, en este estudio retrospectivo no encontramos mutaciones en ninguno de estos genes, sugiriendo que no son una causa común de MCM.

3. Generación de cíbridos transmitocondriales.

Para estudiar la posible patogenicidad de las variantes nucleotídicas identificadas en la secuencia del ADNmt de algunos pacientes, generamos cíbridos transmitocondriales como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Solamente disponíamos de fibroblastos criopreservados de dos de los pacientes (CM18 y CM68). Además, no fuimos capaces de obtener fibroblastos de los otros pacientes por dos motivos: el primero de ellos es que algunos pacientes ya habían fallecido en el momento en el que se realizó este estudio retrospectivo y no había fibroblastos criopreservados disponibles; en segundo lugar, las familias no dieron consentimiento para obtener fibroblastos de aquellos pacientes vivos; únicamente se pudo obtener una muestra de sangre de uno de ellos, (CM48), para generar cíbridos transmitocondriales a partir de plaquetas. El paciente CM68 presentaba la mutación m.7896G>A en el gen mitocondrial MT-CO2 en estado heteroplásmico, por lo que se pudieron generar clones celulares isogénicos, dos homoplásmicos para esa mutación y uno homoplásmico sin mutación, denominados respectivamente clones mutantes y clon control. Sin embargo, en el caso de las variantes nucleotídicas homoplásmicas identificadas, m.9448A>G en el gen MT-CO3 (paciente CM18) y m.1628C>T en el gen

MT-TV (paciente CM48), generamos clones celulares control no isogénicos a partir de plaquetas de dos individuos sanos; estas muestras provenían del banco de plaquetas de individuos sanos, almacenado en el laboratorio, que se generó gracias a la obtención de muestras de sangre de 200 individuos cedidas por el banco de sangre del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Para evaluar la patogenidad de la variante nucleotídica m.9448A>G en el gen MT-CO3, identificada en el genoma mitocondrial del paciente CM18, obtuvimos 2 clones celulares control no isogénicos del haplogrupo K y otros 2 clones celulares control no isogénicos del haplogrupo L2a para evaluar la patogenidad de la variante nucleotídica m.1628C>T identificada en el gen mitocondrial MT-TV en la secuencia del genoma mitocondrial en el paciente CM48. Para evitar efectos clonales, se generaron 2 clones celulares homoplásmicos para cada una de estas dos mutaciones, M1 y M2, y confirmamos por secuenciación la presencia de la variante nucleotídica mitocondrial correspondiente en estado homoplásmico. Cuantificamos el número de copias del ADNmt en cada clon celular para identificar los niveles basales de cada uno de ellos y no se observaron diferencias significativas de las mismas entre los cíbridos mutantes y controles.

3.1. Caracterización bioquímica y molecular de los cíbridos transmitocondriales generados para las variantes nucleotídicas encontradas en genes codificantes de subunidades estructurales del complejo IV.

3.1.1. Determinación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Mediante métodos espectrofotométricos, medimos la actividad enzimática mitocondrial de los diferentes complejos de la CR, así como de la enzima citosólica citrato sintasa. Tras evaluar los resultados, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre las actividades enzimáticas de los complejos de la CR de los cíbridos homoplásmicos para la variante nucleotídica m.9448A>G en el gen *MT-CO3* y sus respectivos controles (datos no mostrados). Sin embargo, en los clones mutantes M1 y M2 portadores homoplásmicos de la mutación m.7896G>A en el gen *MT-CO2* observamos una disminución en la actividad enzimática del complejo IV de la CR mitocondrial, con una media de actividad residual del 14% ($p < 0,005$); la actividad enzimática del resto de complejos de la CR mitocondrial no se vio afectada en estos clones celulares (Tabla 4).

Actividad enzimática de los complejos de la CRM en cíbridos transmitocondriales					
Línea celular	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	CS
CM68 C1	7,18±0,27	39,30±7,39	39,37±15,0	33,81±3,83	164,40±17,85
CM68 M1	6,51±2,20	32,00±9,70	24,97±6,54	5,23±1,27*	165,20±7,45
CM68 M2	5,60±3,73	30,80±8,02	24,60±5,52	4,63±1,72*	166,27±16,12

Tabla 4. Actividad enzimática específica expresada en nmol·min⁻¹·mg de proteína⁻¹. Cada clon celular se analizó individualmente 3 veces (n=3). Los datos se presentan como la media ± error típico. *P<0.005 respecto de la línea CM68 C1 (prueba t de Student). CM68 M1 y CM68 M2, cíbridos mutantes que contienen la mutación m.7896G>A; CM68 C1, control isogénico correspondiente; CS, citrato sintasa; CRM; cadena respiratoria mitocondrial.

3.1.2. Niveles de expresión de los transcritos mitocondriales en líneas celulares de cíbridos homoplásmicos para las mutaciones m.7896G>A y m.9448A>G en el genoma mitocondrial.

En primer lugar, evaluamos si existían diferencias en los niveles de expresión de diferentes genes mitocondriales de los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos para cada una de las mutaciones analizadas, comparadas con las de los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos control. Para este análisis diseñamos y validamos diferentes oligonucleótidos a lo largo de la secuencia del ADNmt. Los resultados mostraron que, comparando los niveles de expresión entre clones celulares control y mutantes, no había diferencias significativas en los niveles de expresión de esos transcritos mitocondriales representativos de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial excepto el complejo II, el único no representado en el genoma mitocondrial.

3.1.3. Evaluación del ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales.

Para verificar si la disminución en la actividad enzimática del complejo IV observada en los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos para la mutación m.7896G>A, pudiera ser debida a una alteración en el ensamblaje de los diferentes complejos y supercomplejos de la CR, se llevaron a cabo ensayos de electroforesis en condiciones nativas (Blue Native-PAGE) con los cíbridos transmitocondriales mutantes y controles. Como se muestra en la Figura 7A, en los clones de cíbridos transmitocondriales mutantes observamos una ausencia de la subunidad COX5A del CIV, indicando un defecto en el ensamblaje de supercomplejos en comparación con el control silvestre. Estos análisis mostraron que los clones celulares transmitocondriales mutantes no tenían completamente ensamblado el CIV y los supercomplejos que contienen citocromo c oxidasa (I+III₂+IV y III₂+IV), provocando una acumulación del supercomplejo I+III₂ y del dímero del complejo III (CIII₂). Además, identificamos un subcomplejo del complejo I de aproximadamente 830 kDa que se acumulaba en los cíbridos transmitocondriales mutantes. Como proteína control de carga, rehibridamos las membranas con una subunidad del complejo II (CII) carente de subunidades codificadas por el ADNmt. Los niveles basales de la cantidad de complejo II fue similar en los cíbridos mutantes (m.7896G>A) y en su control (Figura 7B). La disminución detectada en

los niveles de complejo IV ensamblado y en los supercomplejos I+III₂+IV y III₂+IV nos indicaba que la disfunción en la actividad enzimática del complejo IV se debía a una clara disminución de la cantidad de complejo IV ensamblado. Por tanto, la mutación m.7896G>A en el gen *MT-CO2* del genoma mitocondrial es responsable de este defecto y la acumulación del supercomplejo I+III₂, el dímero III₂ y el subcomplejo del complejo I, es debida a la disminución de los supercomplejos que contienen citocromo c oxidasa.

El mismo análisis se llevó a cabo para los cíbridos transmitocondriales que contenían la variante nucleotídica m.9448A>G en el gen *MT-CO3* del genoma mitocondrial, pero en este caso no detectamos alteraciones en el ensamblaje de los complejos sencillos de la CR ni de los supercomplejos mitocondriales. Al no encontrar diferencias en el ensamblaje ni en la actividad enzimática de los complejos de la CR mitocondrial, los resultados nos hicieron sospechar que la variante nucleotídica m.9448A>G en el gen *MT-CO3* podría ser un polimorfismo en vez de una mutación patogénica mitocondrial.

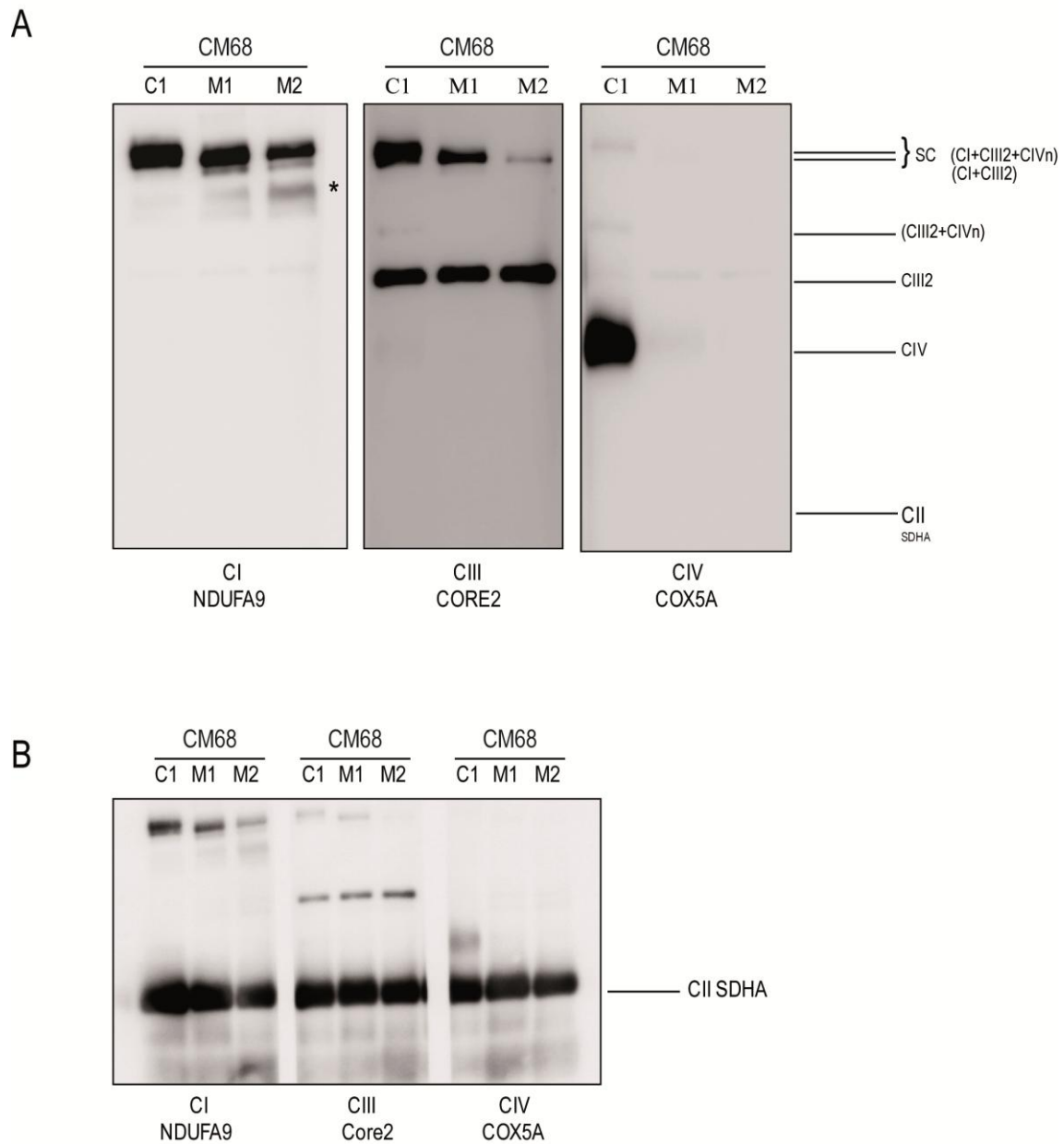


Figura 7. Análisis de los supercomplejos mitocondriales en cibridos transmitocondriales. Se realizó blue native-PAGE sobre las líneas celulares CM68 M1 y CM68 M2, que contienen la variante nucleotídica m.7896G>A, y sobre su control silvestre isogénico correspondiente CM68 C1. **A:** Análisis por western blot usando anticuerpos contra la subunidad NDUFA9 del complejo I (CI), la subunidad CORE2 del complejo III (CIII) y la subunidad COX5A del complejo IV (CIV). *Subcomplejo del complejo I de aproximadamente 830 KDa **B:** las membranas se deshibridaron y rehibridaron usando anticuerpos contra la subunidad SDHA del complejo II (CII) como proteína control de carga.

3.2. Evaluación funcional de la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV* encontrada en el paciente CM48.

3.2.1. Determinación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Como se ha comentado previamente, algunas mutaciones en el genoma mitocondrial producen una disminución en la actividad enzimática de uno o varios de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. En el caso de mutaciones que afectan a ARNt mitocondriales, se han descrito defectos combinados de los complejos OXPHOS (Smits et al., 2010); En el paciente CM48, en el que se identificó la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*, se había obtenido una biopsia de músculo esquelético insuficiente para realizar todos los análisis bioquímicos y moleculares necesarios para el diagnóstico de este paciente, por lo que no se pudo determinar la actividad enzimática de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en este tejido. Sin embargo, las determinaciones espectrofotométricas realizadas en los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos para esta variante nucleotídica no pusieron de manifiesto una disminución en alguna de las actividades enzimáticas de los complejos de la CR mitocondrial (Tabla 5). Una segunda biopsia de músculo esquelético en este paciente demostró un defecto aislado en la actividad enzimática del complejo I mitocondrial (Arredondo et al., 2012).

Actividad enzimática de los complejos de la CRM en cíbridos transmitocondriales					
Línea celular	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	CS
L2a C1	14,93±1,71	40,17±8,07	36,07±6,32	39,13±6,10	268,91±35,03
L2a C2	11,41±2,98	37,70±5,42	24,02±5,44	36,73±7,22	246,03±28,06
CM48 M1	16,09±1,80	35,91±2,79	27,06±5,77	46,54±3,35	253,15±24,60
CM48 M2	12,90±1,93	41,14±5,36	34,87±10,17	41,83±6,27	257,97±34,21

Tabla 5. Actividad enzimática específica expresada en nmol·min⁻¹·mg de proteína⁻¹. Cada clon se analizó individualmente 3 veces (n=3). Los datos se presentan como la media ± error típico. CM48 M1 y CM48 M2, cíbridos mutantes que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T; L2a C1 y L2a C2, cíbridos control correspondientes al mismo haplogrupo; CS, citrato sintasa; CRM; cadena respiratoria mitocondrial.

3.2.2. Curvas de proliferación celular.

La mitocondria como centro energético y organela señalizadora de la célula está implicada, además de en el proceso OXPHOS y síntesis del ATP, en numerosos procesos celulares, entre otros el control de la proliferación celular y la muerte celular programada. Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la variante nucleotídica m.1628C>T observada en el gen *MT-TV* en el paciente CM48 afectaba a la capacidad de crecimiento de los distintos clones celulares transmitocondriales generados. Para ello, se realizaron curvas de proliferación por triplicado tanto en medio suplementado con glucosa 4,5 g/L como principal fuente de carbono, como en medio libre de glucosa suplementado con galactosa 0,9 g/L, con el

fin de forzar la maquinaria respiratoria. Los datos se tomaron contando el número de células vivas cada 24 horas durante 4 días. Adicionalmente se calculó el tiempo de duplicación de cada curva de crecimiento y se calculó la relación del tiempo de duplicación entre las curvas de galactosa y glucosa para cada línea celular.

Como se observa en la figura 8, no se detectó ninguna diferencia en la velocidad de crecimiento cuando los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos mutantes y control se crecían en medio de cultivo celular rico en glucosa. Sin embargo, al crecer los mismos clones celulares en un medio de cultivo con galactosa en vez de glucosa, observamos una ligera disminución, estadísticamente significativa, en las curvas de crecimiento de los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos para la variante nucleotídica, respecto de los controles. Esto podría sugerir que la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV* estaría causando una disfunción mitocondrial leve en estas células, que solamente se pondría de manifiesto en situaciones de estrés metabólico en el que la síntesis de ATP mitocondrial es esencial para la supervivencia celular. Respecto a la relación del tiempo de duplicación galactosa/glucosa de cada línea celular, fue mayor en los híbridos transmitocondriales CM48 M1 y M2 respecto de los controles, indicando que los híbridos que contenían la variante nucleotídica m.1628C>T tardan más en realizar sus procesos de división celular. Sin embargo, debido a la variabilidad de la pendiente en las curvas de crecimiento, las diferencias solo fueron estadísticamente significativas entre el híbrido CM48 M1 respecto de los dos controles L2a C1 y C2 ($p < 0,01$).

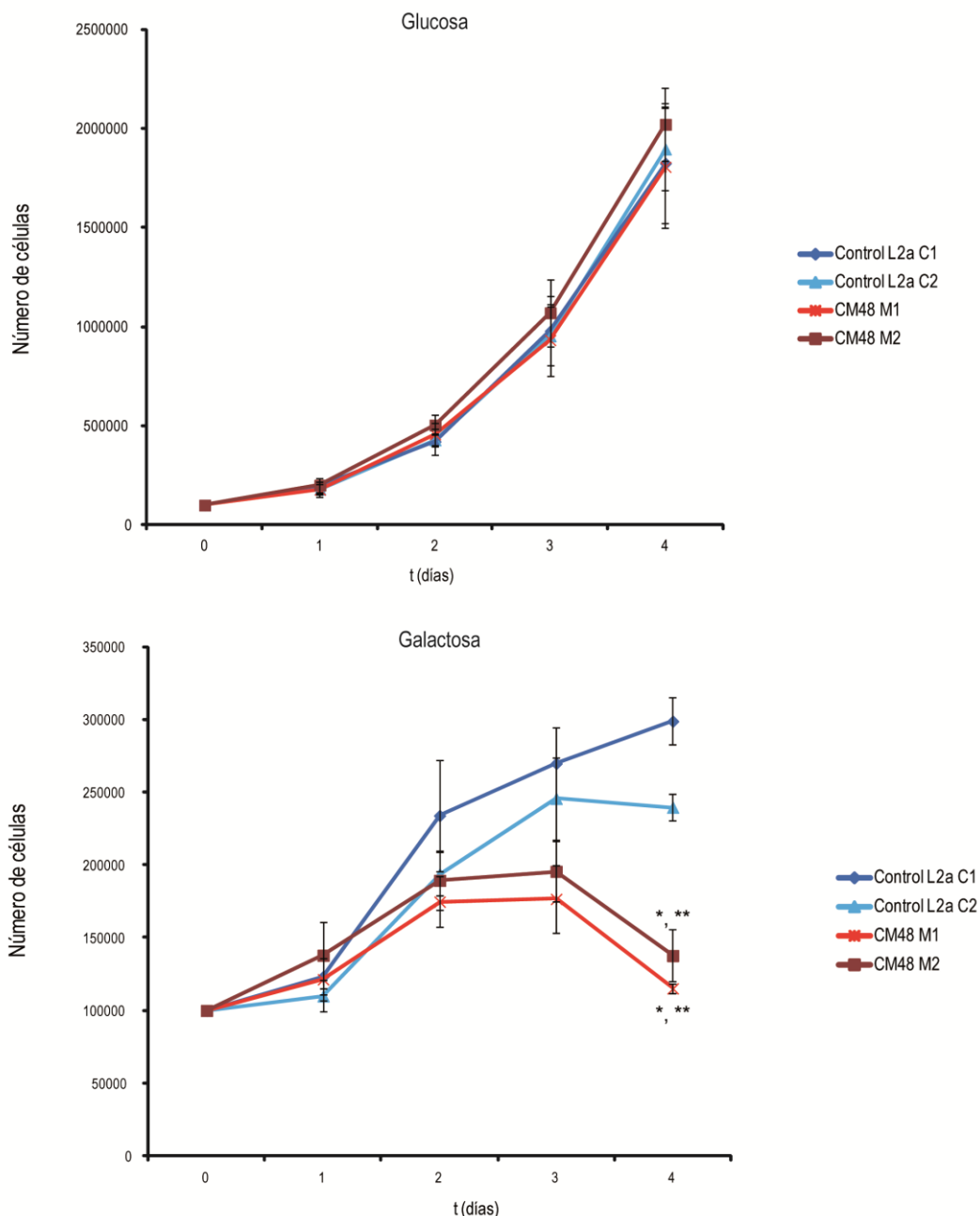


Figura 8. Curvas de crecimiento de líneas de híbridos mitocondriales control, L2a C1 y L2a C2, y los que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*. Las células fueron cultivadas en medio suplementado con glucosa (Gráfica superior) y con galactosa (Gráfica inferior) y contadas utilizando una cámara de Neubauer cada 24 horas. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes (n=3) y las barras el error típico. *P<0,01 respecto de la línea celular L2a C1; **P<0,05 respecto de la línea celular L2a C2 (t de Student).

3.2.3. Cuantificación del ATP basal y consumo de O₂.

Generalmente, la determinación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial nos permite valorar la capacidad máxima de actividad de los mismos de manera individual y en condiciones no limitantes de disponibilidad de sustrato. A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los

cíbridos transmitocondriales con la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*, no se descarta una alteración de la actividad OXPHOS. Por tanto, el potencial defecto de traducción mitocondrial generado en las líneas homoplásmicas transmitocondriales para esa variante nucleotídica en el gen *MT-TV*, podría producir una alteración en la capacidad respiratoria mitocondrial *in vivo*, o en los niveles basales de ATP. Por ello, se midió el consumo de oxígeno en los clones celulares transmitocondriales vivos mediante respirometría de alta resolución y los niveles basales de ATP total y mitocondrial mediante luminometría.

Como se puede observar en la figura 9, los resultados mostraron una leve disminución, estadísticamente significativa, en los niveles de ATP total y mitocondrial de los clones celulares transmitocondriales homoplásmicos para la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*. Sin embargo, el porcentaje de ATP mitocondrial respecto al total, se mantenía tanto en los controles como en los mutantes, con un valor aproximado del 70%, por lo que esta disminución en los niveles de ATP no parece disparar un incremento en el ATP generado en la glucólisis. Curiosamente, esta disminución en los niveles de ATP no se ve reflejada en los datos de consumo de oxígeno, en los que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría deberse a la elevada afinidad de la citocromo C oxidasa por el oxígeno. En cualquier caso, los datos obtenidos revelan que los mutantes presentan una cantidad de ATP levemente disminuida respecto de los controles.

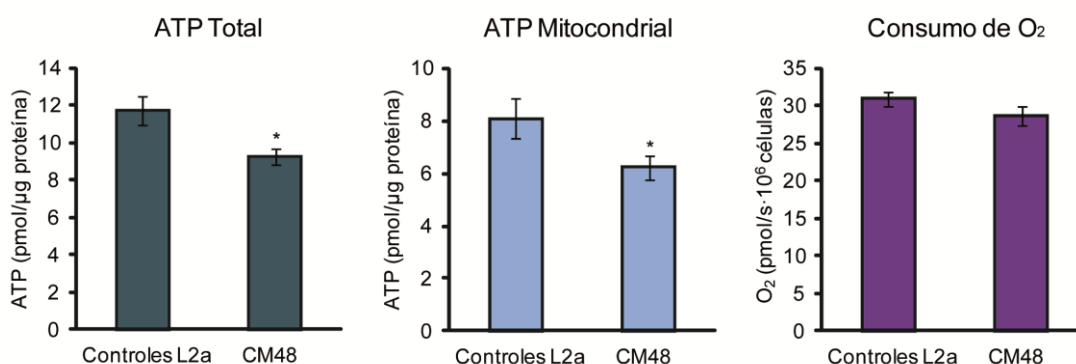


Figura 9. Resultados de la medida de síntesis de ATP total, ATP mitocondrial y de consumo de O₂ acoplado. *P<0,05 respecto de la media de las líneas celulares controles L2a C1 y L2a C2 (t de Student). Las gráficas de ATP representan la media de nueve experimentos independientes (n=9) y las barras el error típico. La gráfica de consumo de O₂ representan la media de cuatro experimentos independientes (n=4) y las barras el error típico. Se calculó, para cada experimento independiente, la media entre las líneas CM48 M1 y CM48 M2 que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T (CM48) y la media entre sus respectivos controles del mismo haplogrupo, L2a C1 y L2a C2 (Controles L2a).

3.2.4. Cuantificación de lactato.

En muchos casos, un defecto en la CR mitocondrial suele ir acompañada de un incremento en la glucólisis, para obtener ATP por esta vía, y como consecuencia se produce la transformación final de piruvato en lactato (Zeviani et al., 1995; McKenzie et al., 2007). Nuestro siguiente objetivo fue la

determinación de lactato, tanto en cíbridos transmitocondriales homoplásmicos para la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*, como en sus controles.

Los resultados obtenidos no demuestran una mayor producción de lactato en los clones celulares homoplásmicos para la variante nucleotídica m.1628C>T el gen *MT-TV* (Figura 10). Estos resultados, junto con el análisis de los niveles de ATP, indican que la glucólisis no se ve incrementada bajo la presencia de la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*. Este dato señala que, los posibles defectos causados por la variante nucleotídica m.1628C>T en ese ARNt mitocondrial no causan, en condiciones normales, una descompensación grave en los requerimientos energéticos de los cíbridos.

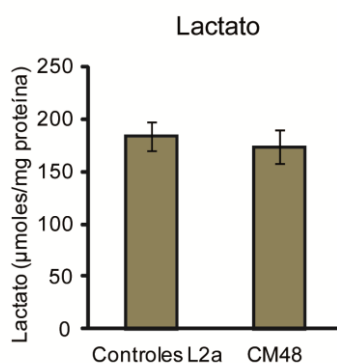


Figura 10. Resultados de la medida producción de lactato. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y las barras el error típico. Se calculó, para cada experimento independiente, la media entre las líneas CM48 M1 y CM48 M2 que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T (CM48) y la media entre sus respectivos controles del mismo haplogrupo, L2a C1 y L2a C2 (Controles L2a).

3.2.5. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Las especies reactivas de oxígeno son generadas principalmente en la mitocondria debido a la fuga de electrones en la cadena respiratoria. La producción de anión superóxido O_2^- está reducida principalmente a los complejos I y III (Bleier et al., 2015). El complejo I libera todo el O_2^- producido en los centros hierro-azufre del brazo periférico a la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III libera el superóxido producido a ambos lados de la membrana. Por tanto, existen potencialmente diferentes mecanismos de señalización dependiendo de la procedencia de los ROS (Muller et al., 2004; Bleier et al., 2015).

Un aumento de la producción de ROS mitocondriales está asociado con situaciones que alteran el transporte de electrones a través de los complejos de la CR mitocondrial, como pueden ser la acción de inhibidores como rotenona o antimicina (Desouki et al., 2005); mutaciones en subunidades de los complejos (Lenaz et al., 2004; Kulawiec et al., 2009); presencia de elementos reguladores de su función como IF1 (Formentini et al., 2012); o defectos en el ensamblaje de los complejos y supercomplejos (Gasparre et al., 2013; Maranzana et al., 2013). Por ello, el aumento de la producción de ROS mitocondriales ha sido propuesto como mecanismo patológico en diferentes enfermedades mitocondriales

y neurodegenerativas (Kirkinezos y Moraes, 2001; Lenaz et al., 2004; Tuppen et al., 2010; Cha et al., 2015), así como un elemento clave en el cáncer (Ishikawa et al., 2008; Weinberg et al., 2010; Martínez-Reyes y Cuezva, 2014; Sabharwal y Schumacker, 2014).

Con objeto de estudiar los niveles de ROS en nuestras líneas de cíbridos transmitocondriales mutantes, se utilizó una sonda fluorescente, 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH), utilizada comúnmente como indicador de estrés oxidativo general.

Los resultados obtenidos tras la utilización de esta sonda DCFH muestran una ligera disminución de estrés oxidativo en los clones celulares transmitocondriales mutantes, con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los control (Figura 11). Por tanto, no se consideró como un defecto de la CR mitocondrial al no aumentar los niveles de ROS. Sin embargo, es lógico pensar que a mayor actividad celular, mayor producción de ROS. Por lo que, esa leve disminución de ROS en los cíbridos transmitocondriales con la variante nucleotídica m.1628C>T, podría deberse a que su metabolismo celular es ligeramente menor al de los controles, tal y como muestran los resultados de la medida de ATP.

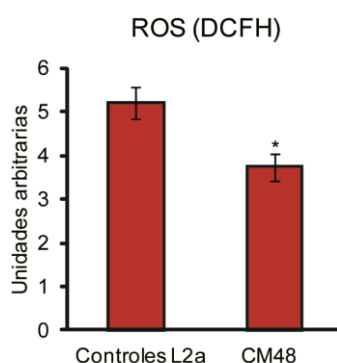


Figura 11. Resultados de ROS general basal, obtenidos por citometría, utilizando la sonda DCFH. * $P < 0,05$ respecto de la media de las líneas celulares controles L2a C1 y L2a C2 (t de Student). La gráfica representa la media de cuatro experimentos independientes ($n=4$) y las barras el error típico. Se calculó, para cada experimento independiente, la media entre las líneas CM48 M1 y CM48 M2 que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T (CM48) y la media entre sus respectivos controles del mismo haplogrupo, L2a C1 y L2a C2 (Controles L2a).

3.2.6. Cuantificación de los niveles del ARNt valina mitocondrial.

Como se ha mencionado anteriormente en los resultados, se han analizado varios parámetros que indican directa o indirectamente la situación de la función OXPHOS en los cíbridos transmitocondriales con la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*, que codifica el ARNt-Val. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un fallo leve en la traducción de proteínas mitocondriales, podría alterar levemente la función OXPHOS, no siendo detectable al analizar los distintos parámetros medidos con anterioridad. Por tanto, aunque no se han detectado diferencias en algunos parámetros, o se han detectado diferencias

leves, no se puede descartar la posible patogenicidad de esta mutación. Por este motivo, se decidió realizar la cuantificación del ARNt-Val mediante northern blot.

Se extrajo ARN de los cíbridos, se desnaturalizó y se electroporaron en gel de poliacrilamida. Después de la transferencia, la membrana se hibridó con olionucleotidos específicos para los ARNt valina y fenilalanina como se ha descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados se analizaron calculando la relación ARNt-Val/Phe, entre controles y mutantes (Figura 12). En presencia de la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*, los niveles del ARNt-Val/Phe no varían con respecto a los observados en los clones celulares transmitocondriales control, siendo los niveles de ARNt-Val muy similares entre las distintas muestras. Sin embargo, no se descarta una posible alteración en la conformación del ARNt-Val, aminoacilación o síntesis de proteínas, aunque teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, es de esperar que no sean detectables diferencias entre clones celulares transmitocondriales control y mutantes.

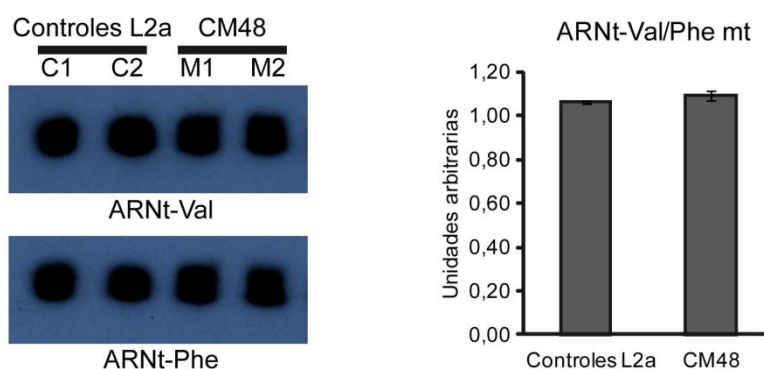


Figura 12. Resultados de la cuantificación de ARNt-Val por northern blot. A la izquierda se muestra una imagen representativa del northern blot realizado con las distintas sondas de ARNt-Val y ARNt-Phe, en el que se utilizó el ARNt-Phe como control de carga. A la derecha se muestra el ratio entre los valores de ARNt-Val y ARNt-Phe. La gráfica muestra la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y las barras el error típico. Se calculó, para cada experimento independiente, la media entre las líneas CM48 M1 y CM48 M2 que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T (CM48) y la media entre sus respectivos controles del mismo haplogrupo, L2a C1 y L2a C2 (Controles L2a). Los datos se relativizaron dando un valor 1 al ratio ARNt-Val/Phe del control L2a C1.

3.2.7. Cuantificación de células apoptóticas tras inducción con estaurosporina.

Bajo condiciones patológicas, determinados factores presentes en las células, como mutaciones en el ADNmt, alteran el balance entre proliferación y apoptosis de las mismas. Sin embargo, también es cierto que estas alteraciones pueden provocar una sensibilización a estímulos, como la utilización de factores inductores de apoptosis (Carrozzo et al., 2004; Zhang et al., 2005). Teniendo en cuenta el importante

papel que tiene la mitocondria en los procesos apoptóticos, se consideró analizar la apoptosis en cíbridos transmitocondriales homoplásmicos para la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*.

Los cíbridos se trataron con estaurosporina y se incubaron con diferentes sondas, como yoduro de propidio (marcaje del núcleo en células muertas) MitoStep (detección de despolarización mitocondrial) y FITC-Anexina V (detección de células en apoptosis). Del análisis por citometría, combinando los 3 fluoróforos, se obtuvieron los resultados representados en la figura 13. Se puede observar cómo en cíbridos con la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*, hay un incremento leve de apoptosis temprana ($p=0,017$) y de células positivas a la tinción con anexina V (apoptosis total) ($p=0,013$). Por otro lado, la disminución de células polarizadas y el aumento de apoptosis tardía no resultaron estadísticamente significativos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados de necrosis entre clones celulares transmitocondriales mutantes y control (datos no mostrados). Este incremento de la apoptosis temprana y la apoptosis general, es demasiado leve y difícil de relacionar con el fenotipo del paciente. Sin embargo se puede interpretar como un reflejo de la disfunción fisiopatológica que pueda estar produciendo la variante nucleotídica m.1628C>T en el gen *MT-TV*.

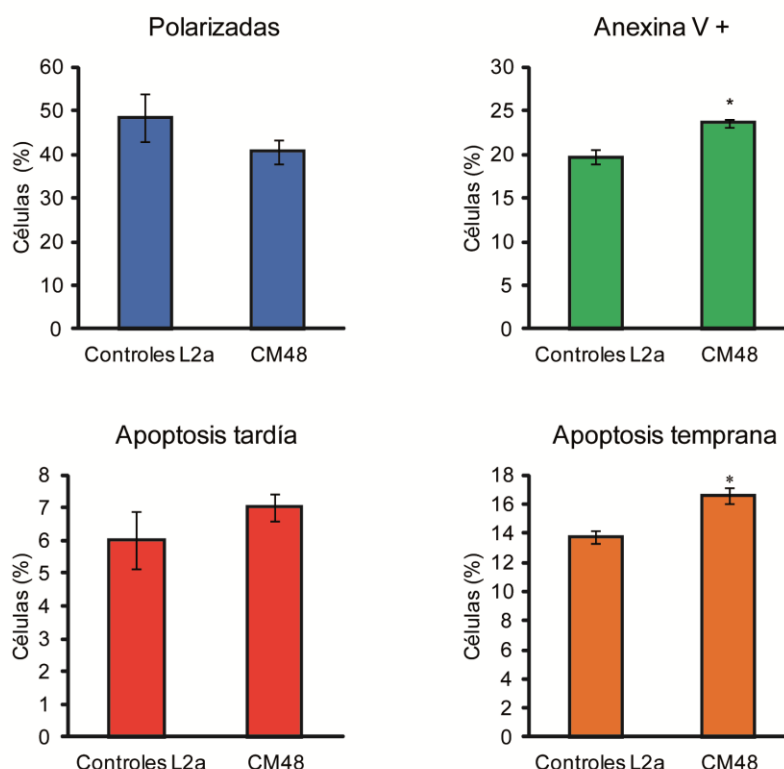


Figura 13. Resultados de apoptosis inducida con estaurosporina, obtenidos por citometría, utilizando las sondas DilC1(5), yoduro de propidio y FITC-Anexina V. Superior izquierda: porcentaje de células positivas a tinción con DilC1(5), cuyas mitocondrias se encuentran polarizadas; Superior derecha: porcentaje de células positivas a tinción con FITC-Anexina V, indicando el porcentaje de células en apoptosis; Inferior izquierda: porcentaje de células positivas a tinción con FITC-Anexina V y con yoduro de propidio, indicando el porcentaje de células en apoptosis tardía; Inferior derecha: porcentaje de células positivas a tinción con FITC-Anexina V y negativas a tinción con yoduro de propidio, indicando el porcentaje de células en apoptosis temprana. * $P < 0,05$ respecto de la media de las líneas celulares controles L2a C1 y L2a C2 (t de Student). Las gráficas representan la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y las barras el error típico. Se calculó, para cada experimento independiente, la media entre las líneas CM48 M1 y CM48 M2 que contienen la variante nucleotídica m.1628C>T (CM48) y la media entre sus respectivos controles del mismo haplogrupo, L2a C1 y L2a C2 (Controles L2a).

4. Generación de líneas celulares ES.

Paralelamente a la evaluación de la patogenicidad de mutaciones en el ADNmt implicadas en miocardiopatías, se propuso desarrollar un estudio funcional sobre cardiomiocitos derivados de células ES, que permitiera evaluar la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas. Para ello, establecimos distintas líneas celulares, modificadas a partir de células ES, en las que poder evaluar la patogenicidad de la mutación p.Gly128Cys en la proteína MYL3, encontrada previamente en nuestro laboratorio (García-Pavia et al., 2011).

Inicialmente obtuvimos dos líneas celulares, resultado de la transfección de la línea ES AMPIGX7, con los plásmidos que contenían los promotores de los genes *Tnni3* y *Myf3* seguidos de la secuencia del gen mCherry. Se eligió la proteína mCherry, que emite fluorescencia roja, puesto que las células AMPIGX7 ya

expresan la proteína eGFP, que emite fluorescencia verde. Tras la transfección, para obtener líneas estables, tratamos las células con zeocina durante 11 días. Las líneas obtenidas se denominaron Tnni3-mCherry y Myl3-mCherry, en las que posteriormente se analizó la fluorescencia de la proteína mCherry para determinar la eficacia de cada promotor mediante microscopía confocal. Adicionalmente, se obtuvieron 4 líneas más, resultado de la transfección de la línea ES AMPIGX7, con los 4 plásmidos que contenían la secuencia del promotor del gen *Tnni3* seguido de las distintas versiones de ADNc, del gen *Myl3*. Entre estas distintas isoformas del gen *Myl3* se encontraban, además de una isoforma con la mutación p.Gly128Cys y la isoforma silvestre, dos isoformas con las mutaciones p.Ala57Gly y p.Met149Val para su utilización como controles positivos, las cuales se han caracterizado previamente en modelos transgénicos de ratón (Sanbe et al., 2000; Muthu et al., 2011). De nuevo, tras la transfección, para obtener líneas estables, tratamos las células con zeocina durante 11 días. Obtuvimos las líneas T-myl3 silvestre, T-myl3 p.Ala57Gly, T-myl3 p.Gly128Cys y T-myl3 p.Met149Val. Aislamos clones individuales por dilución límite y se obtuvo el siguiente número de clones para cada línea: 6 clones de la línea T-myl3 silvestre, 4 clones de la línea T-myl3 p.A57G, 5 clones de la línea T-myl3 p.G128C y 5 clones de la línea T-myl3 p.M149V. Estos 20 clones con la capacidad de sobreexpresar las distintas isoformas de la proteína MYL3, se analizaron para evaluar la patogenicidad de las distintas mutaciones.

4.1. Análisis de los niveles de expresión de mCherry dirigida por los promotores de *Tnni3* y *Myl3* por microscopía confocal.

Para sobreexpresar la proteína mutada específicamente en cardiomiocitos es necesario un promotor específico de estas células. Ante la ausencia de datos sobre la caracterización del promotor de *Myl3*, siendo el promotor más apropiado, ya que es el del gen en estudio. El fragmento utilizado del promotor de *Myl3* se seleccionó en base a su conservación evolutiva, para lo que se utilizaron los alineamientos múltiples precomputados disponibles en el servidor de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC Genome Browser) (Kent et al., 2002). Teniendo en cuenta que el fragmento elegido de este promotor puede no ser suficientemente específico, se decidió utilizar también el promotor de la Troponina I cardíaca (*Tnni3*). Este promotor está bien caracterizado en la literatura (Lisi et al., 1998), y ya se ha utilizado con anterioridad en nuestro laboratorio (Guerrero et al., 2010). Para demostrar la eficacia de los promotores seleccionados, evaluamos su funcionamiento analizando la expresión de la proteína fluorescente mCherry, dirigida por ambos, en cardiomiocitos derivados de las líneas celulares ES AMPIGX7, Myl3-mCherry y Tnni3-mCherry. Estos cardiomiocitos, obtenidos mediante diferenciación por el método de gotas colgantes y purificación por gradientes de percoll, son identificables por la presencia de la proteína verde fluorescente eGFP.

Como se puede ver en la figura 14, tras el análisis de los cardiomiocitos derivados de células ES por microscopía confocal, se observó un aumento de la fluorescencia correspondiente a mCherry, en los

cardiomiocitos derivados de la línea *Tnni3*-mCherry. Los resultados nos llevaron a descartar el promotor del gen *MyI3* por dos motivos: primero, porque en células ES indiferenciadas de la línea celular *MyI3*-mCherry, se observó que había señal de mCherry (Figura 14A); y en segundo lugar, porque en cardiomiocitos de la línea celular *MyI3*-mCherry los niveles de mCherry eran mucho más bajos que en cardiomiocitos de la línea *Tnni3*-mCherry (Figura 14B), indicando que el fragmento del promotor de *MyI3* no era suficientemente específico de cardiomiocitos. Finalmente se determinó que el fragmento del promotor del gen *Tnni3* era el más apropiado, y decidimos transfectar la línea AMPIGX7, con los distintos plásmidos portadores del promotor *Tnni3* seguido de las distintas isoformas de *MyI3*.

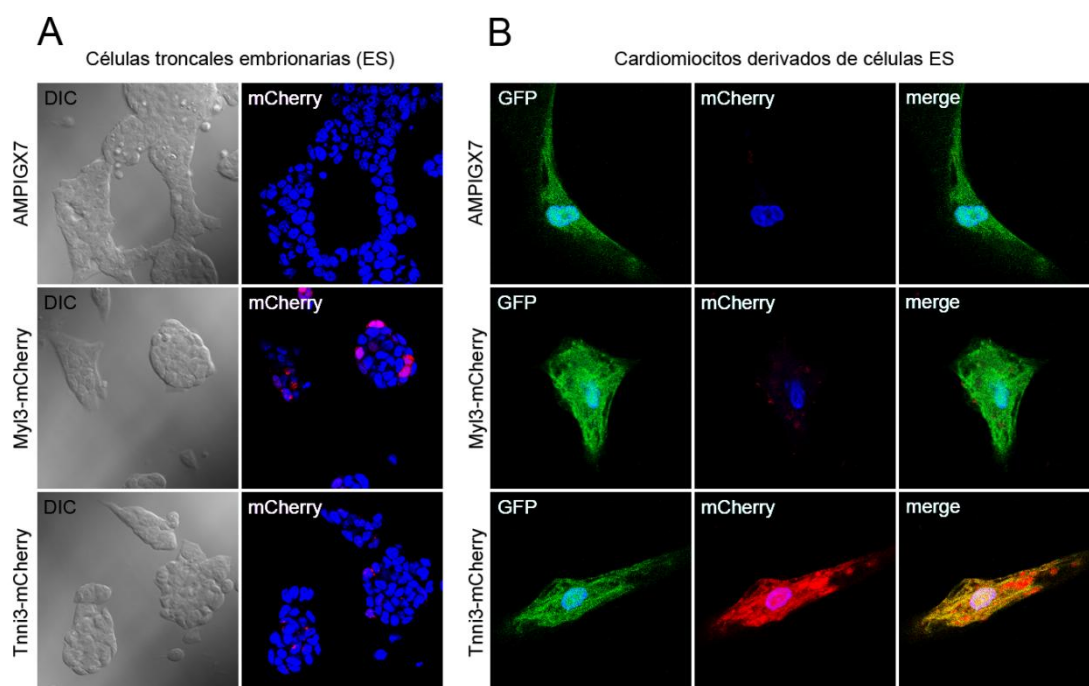


Figura 14. Imágenes de microscopía confocal del análisis de la expresión de la proteína mCherry, para evaluar la expresión dirigida por las secuencias promotoras de *MyI3* y *Tnni3*. Se analizaron células AMPIGX7 sin transfectar, células transfectadas con la construcción *MyI3*-mCherry, y células transfectadas con la construcción *Tnni3*-mCherry. **A.** Expresión de mCherry dirigida por los promotores de *MyI3* y *Tnni3* en células ES no diferenciadas. A la izquierda se muestran las imágenes en DIC y a la derecha las imágenes en fluorescencia, la expresión de mCherry (Rojo), contrastada con tinción nuclear Dapi (Azul). **B.** Expresión de mCherry dirigida por los promotores *MyI3* y *Tnni3* en cardiomiocitos derivados de células ES. Expresión de mCherry (Rojo), contrastada con tinción nuclear Dapi (Azul), y expresión de GFP (Verde), contrastada con tinción nuclear Dapi (Azul).

4.2. Análisis de los niveles de expresión de ARN por qPCR.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión de la proteína mCherry, se deduce que el promotor del gen *Tnni3* actuará de igual forma con las distintas isoformas de *MyI3*, aumentando su expresión. Para verificarlo, realizamos un análisis de expresión por RT-qPCR del gen *MyI3*. Lamentablemente, debido a la variabilidad entre las distintas muestras de cardiomiocitos derivados de células ES, los datos obtenidos de cada clon celular no eran reproducibles. Esto impidió obtener diferencias significativas que verificaran la sobreexpresión de *MyI3* en los distintos clones celulares,

comparándolos con la línea AMPIGX7 (datos no mostrados). Junto con el gen *MyI3*, también se analizaron otros genes que codifican proteínas sarcoméricas, o genes cuya expresión está implicada de algún modo en el desarrollo de la hipertrofia, como el gen de la cardiotrofina 1 (*Ctf1*) o el gen de la creatina kinasa mitocondrial 2 (*Ckmt2*) (Yamauchi-Takahara y Kishimoto, 2000; Miceli y Jazwinski, 2005), para así poder evaluar el posible efecto patogénico que puedan tener las distintas mutaciones sobre la expresión de estos genes. En cualquier caso, los resultados de expresión génica fueron similares, no pudiendo obtener diferencias significativas entre el efecto de las distintas isoformas de *MyI3*, debido a la variabilidad en la obtención de las distintas muestras de cardiomiocitos (datos no mostrados).

4.3. Análisis de la estructura del sarcómero.

Pese a no haber podido verificar la sobreexpresión de *MyI3* en los distintos clones celulares obtenidos, y no haber podido evaluar la patogenicidad de las distintas mutaciones, analizando la expresión de distintos genes implicados en hipertrofia, decidimos analizar las posibles diferencias que pudieran acarrear estas mutaciones en la morfología interna de los cardiomiocitos. Previamente, se ha descrito, que mutaciones en proteínas sarcoméricas pueden causar un defecto grave en la organización del sarcómero de los cardiomiocitos (Dumka et al., 2006; Kraft et al., 2013; Moore et al., 2014). Por tanto, analizamos las posibles diferencias que pudiera haber entre los sarcómeros de cardiomiocitos con las distintas isoformas de MYL3, mediante microscopía confocal.

Obtuvimos imágenes de la estructura del sarcómero de cardiomiocitos derivados de células ES, tras teñir las proteínas sarcoméricas. Se utilizó faloidina TRITC para poder analizar la integridad de los filamentos finos (Figura 15), y el anticuerpo anti-MYL3 para analizar la integridad de los filamentos gruesos (Figura 16). Como se muestra en la figura 15, el análisis por microscopía confocal, permite el análisis en gran detalle de la estructura del sarcómero. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los clones celulares, portadores de las distintas mutaciones, presentaba diferencias en la estructura sarcomérica, al compararlos con los clones celulares que sobreexpresaban la isoforma silvestre (Figura 16). Este dato no nos permite descartar la patogenicidad de las distintas mutaciones, puesto que bien podría ser debido a la ausencia de la sobreexpresión, o al hecho de que este tipo de mutaciones, al contrario de lo que se ha publicado anteriormente (Sanbe et al., 2000) hacen que la proteína mutada no se integre en el sarcómero, no alterando en este caso, ni su función ni su estructura, y posiblemente no deberían analizarse en un modelo mediante sobreexpresión.

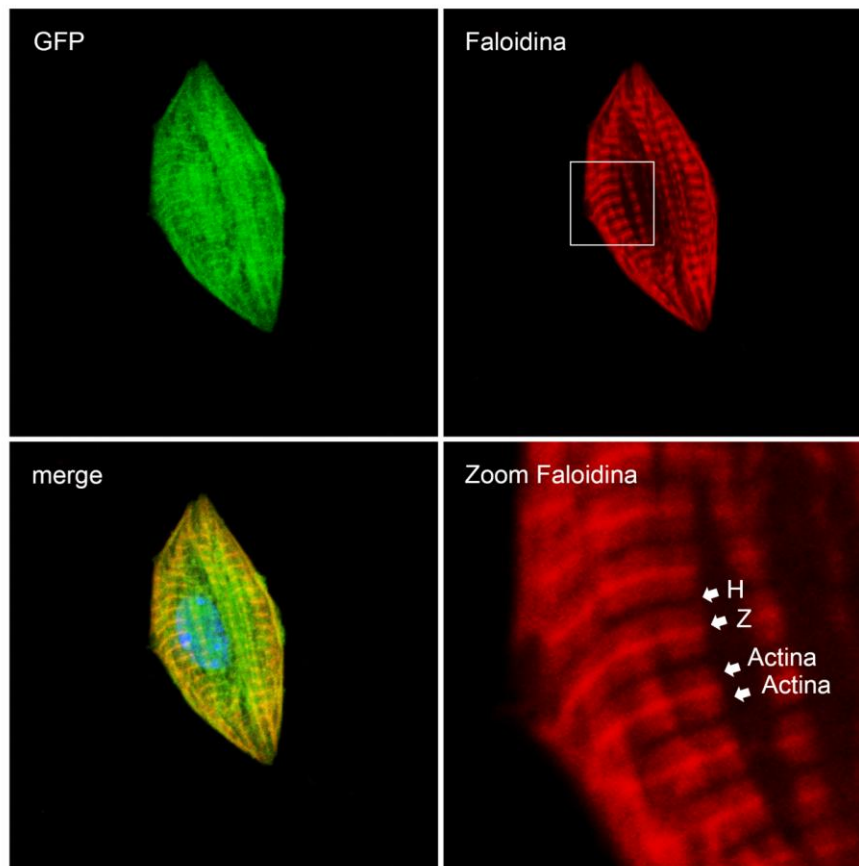


Figura 15. Imagen de microscopía confocal del análisis de la estructura del sarcómero. El análisis se realizó mediante tinción con faloidina de cardiomiocitos derivados de células ES, de la línea celular AMPIGX7. Superior izquierda: expresión de GFP específica de cardiomiocitos AMPIGX7; Superior derecha: tinción con faloidina TRITC; Inferior izquierda: superposición de la expresión de y de la tinción con faloidina contrastada con Dapi; Inferior derecha: detalle ampliado del sarcómero. Las flechas indican la zona H de los filamentos gruesos, la línea Z, y los filamentos finos de actina.

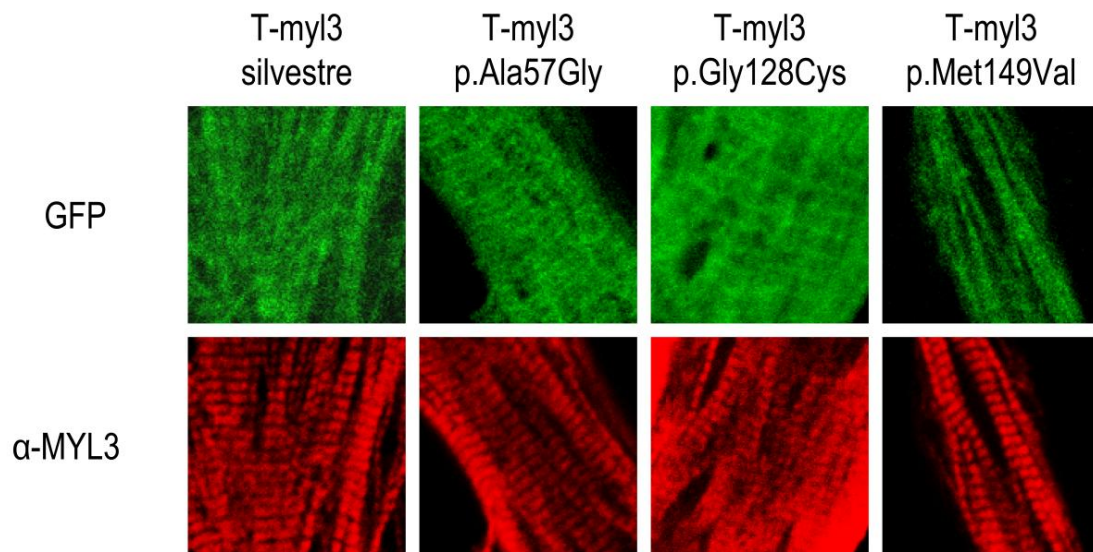


Figura 16. Imagen de microscopía confocal del análisis de la estructura del sarcómero. El análisis se realizó mediante tinción de cardiomiocitos derivados de células ES, con el anticuerpo policlonal α -MYL3. Se muestran imágenes de la línea celular control, transfectada con la isoforma silvestre del gen *MyI3*, y de las líneas celulares transfectadas con las distintas variantes nucleotídicas en el gen *MyI3*. Las imágenes superiores muestran la expresión de GFP específica de cardiomiocitos AMPIGX7 y de líneas celulares derivadas; las imágenes inferiores muestran estructura del sarcómero mediante la tinción con α -MYL3.

Discusión

1. Mutaciones en el ADNmt pueden generar un fenotipo de MCM.

Uno de los tejidos que con relativa frecuencia está afectado en las enfermedades mitocondriales es el músculo cardíaco, pero la identificación de pacientes con sospecha de miocardiopatía de origen mitocondrial no es tarea fácil, entre otros motivos por el predominio de la afectación del músculo esquelético y SNC en las EM y por la dificultad en la obtención de muestras cardíacas en estos pacientes (Lev et al., 2004). Este último punto es de gran importancia, porque, contradiciendo los criterios clásicos de afectación multisistémica en las EM, cada vez se describen con mayor frecuencia fenotipos clínicos en los que la patogenicidad de una mutación en el ADNmt es específica de tejido, en este caso el miocardio. Además, estas mutaciones suelen ser homoplásmicas, por lo que la dificultad diagnóstica es aún mayor (Taylor, Giordano, et al., 2003).

Aquí se presentan los resultados de un análisis mutacional a gran escala del genoma mitocondrial y de 13 genes candidatos nucleares en una cohorte de 45 pacientes seleccionados con sospecha de MCM. Desde un punto de vista clínico, los pacientes incluidos en este estudio ejemplifican la descripción clásica de enfermedad mitocondrial: “cualquier edad, cualquier síntoma, cualquier órgano” (DiMauro y Schon, 2003; Rötig y Munnich, 2003). La frecuencia de MCM en los niños representados (75%) es similar a la presentada por otros grupos (Holmgren et al., 2003; Scaglia, 2004). Además, la frecuencia de los diferentes síntomas no cardíacos es similar a la encontrada en estudios previos de pacientes pediátricos con enfermedad mitocondrial, especialmente respecto a las manifestaciones neuromusculares (Debray et al., 2007).

La elevada tasa de mortalidad en los pacientes pediátricos representados coincide con la de varios estudios, pero no coincide con el estudio de García-Cazorla et al. (2005). Tales discrepancias sobre la frecuencia de disfunción cardíaca en EM, sobre las manifestaciones no-cardíacas, y sobre la tasa de mortalidad entre los distintos estudios, muestran que la caracterización de las MCMs sigue siendo incompleta. Por tanto, son necesarios estudios adicionales para entender el espectro completo de las MCMs en pacientes con enfermedad mitocondrial.

Los resultados de diagnóstico basados en análisis bioquímicos e histoquímicos, muestran la complejidad de la diagnosis de enfermedad mitocondrial. Por un lado, alrededor del 40% de los pacientes pediátricos representados con MCM-plus no mostraron defectos en la CR mitocondrial, como es común en estos pacientes (García-Cazorla et al., 2005). Además, la mayoría de los pacientes muestran parámetros histoquímicos normales (Tabla 2). En base a esto, se decidió utilizar, como criterio clínico, el fenotipo de MCM-plus, para seleccionar a los pacientes del presente estudio, de acuerdo con un diagnóstico apropiado de MCM, y para evitar una selección sesgada.

En los análisis genéticos de los 45 pacientes con MCM-plus, se identificaron 9 variantes nucleotídicas distintas, potencialmente causantes de EM en el ADNmt (Tabla 3). Estas 9 variantes nucleotídicas se

encontraban en los genes *MT-ND1*, *MT-ND5*, *MT-CO2*, *MT-CO3* y *MT-ATP8*, que codifican subunidades estructurales; en el gen *MT-RNR1*, que codifica el ARN ribosómico 12S; y en los genes *MT-TL1* y *MT-TV*, que codifican dos ARN transferentes.

1.1. Mutación patogénica m.3243A>G en el gen MT-TL1 está asociada a MCM.

Una de las mutaciones encontradas fue m.3243A>G, identificada en el gen *MT-TL1*, en un paciente con MCD, déficit cognitivo, sordera y diabetes. Aunque los fenotipos neuromusculares suelen dominar el cuadro clínico de los pacientes portadores de esta mutación, muchos de ellos desarrollan miocardiopatías (Majamaa-Voltti et al., 2002; Vydut et al., 2007; Malfatti et al., 2013). Sin embargo, el desarrollo de miocardiopatías causado por esta mutación, suele pasarse por alto hasta que alcanza un estado avanzado, como es el caso de una paciente que tenía 42 años cuando se le diagnosticó MCM (Hollingsworth et al., 2012).

1.2. Las variantes nucleotídicas m.12923G>T en el gen MT-ND5 y m.8519G>A en el gen MT-ATP8 se han clasificado como posibles polimorfismos.

La variante m.12923G>T (p.Trp196Leu), se encontró en un paciente con MCR, hiperintensidad en los ganglios basales e imágenes similares a derrames cerebrales en el lóbulo occipital; y la variante m.8519G>A (p.Glu52Lys) se encontró en un paciente con MCD, fallo renal, hipotonía y atrofia muscular. Ambas variaciones de secuencia, se consideraron inicialmente como posibles nuevas mutaciones por varias razones: en primer lugar, no se habían encontrado en controles sanos o en las bases de datos disponibles en el momento en que fueron identificadas; en segundo lugar, ambas variaciones nucleotídicas están asociadas con un fenotipo clínico mitocondrial; en tercer lugar, la variante m.12923G>T está localizada en el gen *MT-ND5*, y en este gen se han observado mutaciones en pacientes con fenotipos clínicos similares al del paciente presente (Lim et al., 2009), además, la otra variante, m.8519G>A, se localiza en el gen *MT-ATP8*, y una mutación en este gen se encontró en un paciente con MCM y síntomas musculares (Jonckheere et al., 2008); en cuarto lugar, la variante m.12923G>T está en una posición muy conservada evolutivamente, y la variante m.8519G>A está en una posición conserva solo en mamíferos; y en quinto y último lugar, se observó una deficiencia enzimática combinada de los complejos de la CR mitocondrial I, III y IV en el paciente con la variación nucleotídica m.12923G>T. Ambas variantes, sin embargo, fueron recientemente asociadas a haplogrupos en Phylotree, un árbol filogenético global de variaciones en el ADNmt humano (<http://www.phylotree.org/>) (Behar et al., 2012); la variante m.12923G>T se asoció al haplogrupo W. De manera similar, Phylotree describe la variación m.8519G>A asociada con el haplogrupo mitocondrial I de origen europeo. Ambos haplogrupos coinciden con los haplogrupos asignados a estos pacientes (CM47 y CM53) (Tabla 3), lo

cual sugiere que probablemente ambas mutaciones son polimorfismos del ADNmt. Sin embargo, podría ser necesaria una aproximación con cíbridos transmitocondriales, para clasificar, con certeza, estas variaciones como mutaciones patogénicas o polimorfismos.

1.3. La variante nucleotídica m.9448A>G en el gen *MT-CO3* no produce defectos en el sistema OXPHOS de cíbridos transmitocondriales y se ha clasificado como un polimorfismo.

Con el cambio de secuencia m.9448A>G (p.Tyr81Cys) identificado en el gen *MT-CO3* (Tabla 3) ocurre algo similar a las dos últimas variaciones nucleotídicas mencionadas. En un principio, se consideró como posible mutación patogénica, pero los análisis funcionales, por medio de cíbridos transmitocondriales, indicaron que todos los parámetros estudiados eran normales, sugiriendo que es una variación polimórfica del ADNmt. De acuerdo con esto, cuando se revisaron todas las bases de datos mitocondriales, se encontraron 3 secuencias de ADNmt que contenían la variante m.9448A>G, indicando que pertenecía al haplogrupo (K), siendo el mismo haplogrupo que el de la muestra de este paciente (CM18) (Tabla 3) (van Oven et al., 2012).

1.4. La variante nucleotídica m.1291T>C en el gen *MT-RNR1* es una posible mutación patogénica.

La variación de la secuencia m.1291T>C, localizada en el gen *MT-RNR1*, se encontró en homoplasmia en un único paciente (CM19). Aunque no ha sido posible realizar análisis funcionales de esta mutación debido a la carencia de muestra, varios datos indican que esta variación en la secuencia podría ser relevante desde un punto de vista funcional: en primer lugar, la mutación está asociada a un fenotipo mitocondrial de MCD, trasplante cardíaco, déficit cognitivo, dispraxia y laxitud ligamentosa; en segundo lugar, se han observado mutaciones, en el mismo gen mitocondrial, en pacientes con una rara variedad de MCH (Prasad et al., 2006); en tercer lugar, solo se identificó 3 veces en un total de más de 6000 secuencias de ADNmt en bases de datos públicas y en más de 700 secuencias de ADNmt en nuestro laboratorio, las cuales incluyen controles y muestras de un amplio espectro de condiciones patológicas asociadas a disfunción mitocondrial (como una indicación de su carácter patogénico, las 4 muestras corresponden a diferentes haplogrupos (Apte et al., 2006): dos de ellas pertenecían al haplogrupo africano L1c, una al macrohaplogrupo común R6a1 en el oeste de Eurasia, y este paciente (CM19) pertenecía al haplogrupo europeo V); y en cuarto y último lugar, la variante m.1291T>C se encuentra en una posición que no está completamente conservada a lo largo de la escala evolutiva, pero no se debería descartar categóricamente, la patogenicidad de esta variante, en base a este dato. De hecho, hay varias mutaciones puntuales patogénicas confirmadas en genes que afectan posiciones no conservadas evolutivamente en el ADNmt, ni siquiera en primates (Yarham et al., 2011). Entre ellas, se encuentran las

mutaciones m.8356T>C y m.8344A>G en el gen MT-TK asociado con epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas. Los cíbridos transmitocondriales, que contenían estas mutaciones, presentaban defectos severos en la actividad enzimática de la CR, en la síntesis de proteínas y en los niveles basales de productos de traducción mitocondrial (Masucci et al., 1995).

1.5. La variante nucleotídica m.3721A>G MT-ND1 es una posible mutación patogénica.

El cambio de secuencia m.3721A>G en el gen *MT-ND1* fue considerado también como una probable mutación patogénica por razones similares: en primer lugar, esta variante homoplásmica se encontró asociada con un fenotipo mitocondrial de MCD con hipotonía y deficiencia de los complejos I y IV de la CR mitocondrial; y en segundo lugar esta variación altera un aminoácido (Thr139) con alto grado de conservación, el cual sugiere una relevancia funcional de este residuo. Sin embargo, son necesarios estudios funcionales prospectivos para evaluar el impacto patogénico de esta mutación. Desafortunadamente, no fue posible realizar ningún análisis, porque el paciente murió debido a fallo multiorgánico a las pocas horas de nacer.

1.6. La mutación patogénica m.7896G>A genera un defecto en el ensamblaje y función del complejo IV en cíbridos transmitocondriales.

Como se ha señalado previamente, varias evidencias respaldan la patogenicidad de la mutación sin sentido (m.7896G>A; p.Trp104Stop) identificada en un paciente con MCH y enfermedad mitocondrial (CM68). Los resultados muestran que había una deficiencia en la actividad enzimática del complejo IV y una alteración del ensamblaje de este, al analizar biopsia de músculo (Campos et al., 2001) y cíbridos transmitocondriales del paciente. De hecho, los resultados muestran que los cíbridos transmitocondriales mutantes del gen *MT-CO2* tienen carencia de complejo IV completamente ensamblado y supercomplejos que contienen COX (I+III₂+IV y III₂+IV), además de mostrar una acumulación del supercomplejo I+III₂ y del dímero CIII₂. También hay acumulación del ensamblaje intermedio, de un supercomplejo de aproximadamente 830 kDa, que aparece en los cíbridos mutantes, correspondiente a un ensamblaje intermedio fisiológico del CI que se acumula en células de pacientes con la mutación patogénica. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos, en los cuales los autores investigaron la ruta biosintética de supercomplejos mitocondriales (Moreno-Lastres et al., 2012), por lo que podemos clasificar la variante nucleotídica m.7896G>A como una mutación patogénica.

1.7. Las variaciones de secuencia m.1644G>A y m.1628C>T en el gen MT-TV afectan de forma distinta a la función OXPHOS.

El análisis de dos de las mutaciones, m.1628C>T y m.1644G>A, se llevó a cabo, previamente en nuestro grupo, a partir de biopsias musculares de dos de los pacientes, CM39 y CM48 (Arredondo et al., 2012). Estas biopsias permitieron analizar la actividad enzimática de los complejos de la CR mitocondrial, para ambos pacientes, además de los niveles basales de ARNt-Val en el caso del paciente portador de la mutación m.1644G>A. Los análisis mostraron una reducción selectiva de los niveles basales del ARNt-Val en el paciente, respecto a sus controles. También se observaron deficiencias en la actividad enzimática de los complejos I y IV, en el caso del paciente portador de m.1644G>A, y en el complejo I, en el caso del portador de m.1628C>T (Arredondo et al., 2012). Respecto a la variante nucleotídica m.1628C>T, aunque muchas mutaciones en genes de ARNt mitocondriales causan una deficiencia combinada en la cadena respiratoria, no sería el primer caso en el cual una mutación en un gen de un ARNt mitocondrial causa una deficiencia aislada del complejo I. Recientemente, Da Pozzo et al. (2009) reportó un paciente con ataxia severa, retinitis pigmentosa, disartria, hipoacusia bilateral, nistagmos y leucoencefalopatía, con una mutación puntual en el gen MT-TP, que codifica el ANRt-Pro mitocondrial, y una deficiencia aislada en el complejo I de la cadena respiratoria.

Las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el gen *MT-TV* no son muy comunes, pero 3 de las 7 mutaciones descritas hasta la fecha, en este gen, se han asociado con MCH (Chalmers et al., 1997; McFarland et al., 2002; Blakely et al., 2004). De acuerdo con estos 3 casos reportados, 2 de los pacientes presentes (CM39 y CM48) desarrollaron anomalías de conducción cardíaca, MCH y un cuadro neurológico, por lo que se sospechó una enfermedad mitocondrial en ambos casos. Adicionalmente, merece la pena mencionar que el porcentaje de heteroplasmia es más alto en músculo esquelético de pacientes con MCMs y mutaciones en el gen *MT-TV* que en pacientes sin defectos de corazón y mutaciones en el mismo gen (Taylor et al., 1996; de Coo et al., 1998; Tiranti et al., 1998; Sacconi et al., 2002; Tanji et al., 2008; Horváth et al., 2009). Por lo tanto, probablemente sea necesario un porcentaje de heteroplasmia elevado de mutaciones en el gen *MT-TV* asociadas a EM para afectar al músculo cardíaco.

El primer dato que llama la atención es que la deficiencia en la actividad enzimática del complejo I en biopsia de músculo con la variación m.1628C>T (Arredondo et al., 2012) no concuerda con los datos obtenidos tras el análisis en cíbridos transmitocondriales, en los que no se ha observado dicha deficiencia. Probablemente, dicho paciente (CM48) sea portador de una mutación en uno de los genes implicados en el funcionamiento del complejo I, y dicha mutación sea la auténtica responsable del fenotipo clínico de este paciente. Sin embargo, el hecho de que este paciente pueda ser portador de otra mutación no descarta el posible carácter patogénico de la variante de secuencia m.1628C>T.

Al comparar los resultados aquí obtenidos, entre los cíbridos transmitocondriales portadores de la variación m.1628C>T y sus respectivos controles del mismo haplogrupo, hemos podido observar una leve disminución en distintos parámetros: proliferación celular en condiciones de galactosa y niveles basales de ATP total, ATP mitocondrial y ROS. Además se ha observado un leve aumento en el porcentaje de apoptosis temprana y apoptosis total tras inducción con estaurosporina. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ni en los datos de actividad enzimática de ninguno de los complejos de la CR mitocondrial, ni en consumo de oxígeno, ni en niveles basales de ARNt-Val, ni en producción de lactato. Aunque no hay diferencias en los niveles basales de ARNt-Val, la variante nucleotídica 1628C>T, podría estar afectando directamente a otros parámetros como la conformación y la aminoacilación del ARNt-Val y a la síntesis de proteínas. Por otro lado, el hecho de no haber observado un aumento en la producción de lactato de los cíbridos con la variación m.1628C>T, indica que, la leve disminución en los niveles de ATP total y mitocondrial, no es suficiente como para disparar la glucólisis en estas células. Las disminuciones en los niveles de ATP, en el crecimiento en galactosa y en los niveles de ROS, bien podrían deberse a una menor actividad metabólica de estas células, causada por esta variante. Una menor actividad metabólica podría, a su vez, agravar el carácter patogénico de otra mutación acompañante. En el paciente CM48, portador de esta variante, es muy probable la presencia de una mutación que afecte al funcionamiento del complejo I, por lo que, la variante m.1628C>T, podría estar afectando negativamente al desarrollo de su patología. No podemos descartar ni afirmar el carácter patogénico de la variación de secuencia m.1628C>T, puesto que nuestros resultados no explican el fenotipo del paciente, ni los resultados del análisis de la biopsia muscular. Sin embargo, la leve menor actividad metabólica, de los cíbridos transmitocondriales con esta variante, hace que lo consideremos un posible factor de riesgo a tener en cuenta. En investigaciones futuras sería interesante analizar el efecto de la variante m.1628C>T junto con distintas mutaciones.

1.8. Los 13 genes mitocondriales analizados, codificados en el ADN nuclear, no presentan mutaciones n ninguno de los pacientes analizados.

Además de mutaciones en el ADNmt, hay muchos artículos que describen casos de MCM asociada a mutaciones en genes del ADN nuclear (Jaksch et al., 2000; Loeffen et al., 2001; Antonicka, Leary, et al., 2003; Antonicka, Mattman, et al., 2003; Bénit et al., 2003; Vahsen et al., 2004; Palmieri et al., 2005; Verhoeven et al., 2011). En el artículo presente, se han analizado 13 genes nucleares involucrados en el funcionamiento de la CR mitocondrial, en los 39 pacientes sin mutaciones patogénicas en el ADNmt, pero no se encontraron mutaciones, lo que sugiere que estos genes no son una causa molecular común de MCM.

El motivo de analizar solamente 13 genes nucleares, implicados en la función OXPHOS, se debió principalmente a la limitada cantidad de muestra biopsiada de cada paciente. Probablemente, al elegir únicamente aquellos genes que se han asociado a miocardiopatías en la literatura, se están ignorando otros posibles genes causantes de estas enfermedades. Sin embargo, ésta es la mejor aproximación, teniendo en cuenta que determinadas mutaciones en genes concretos causan frecuentemente el mismo fenotipo patológico. Un claro ejemplo es el de la mutación m.3243A>G en el gen *MT-TL1* que se ha asociado frecuentemente a miocardiopatías (Majamaa-Voltti et al., 2002; Vydut et al., 2007; Malfatti et al., 2013), encontrándose, además, entre las mutaciones, del genoma mitocondrial, analizadas en nuestros pacientes (Tabla 3).

Los 13 genes candidatos se seleccionaron en base a estudios previos en los que se asociaban dichos genes a miocardiopatías. Entre éstos se encuentran aquellos que codifican subunidades estructurales del complejo I (Loeffen et al., 2001; Bénit et al., 2003) y proteínas accesorias para el funcionamiento del complejo IV (Jaksch et al., 2000; Antonicka, Leary, et al., 2003; Antonicka, Mattman, et al., 2003). Además, para poder analizar todas las posibles causas, también se analizaron genes implicados en la traducción, en la replicación y aquellos que afectaban de forma indirecta la función OXPHOS. Uno de ellos es el gen *ANT1*, que codifica la adenina nucleótido translocasa 1 encargada del intercambio de ATP y ADP entre el citosol y la mitocondria, puesto que se ha descrito el primer caso de miopatía y MCH asociado a una mutación en este gen (Palmieri et al., 2005). La ausencia de esta misma proteína, ANT1, debida a una mutación en la región promotora del gen, es la implicada en el síndrome de Senger, una EM poco frecuente y caracterizada por MCH, cataratas congénitas y acidemia láctica, (Jordens et al., 2002). También se eligió el gen *POLG*, en base a distintos estudios, como el de una familia en la que se encontró una mutación en este gen, causando un fenotipo de miocardiopatía moderada, además de oftalmoplejía, trastornos de la marcha, parkinsonismo, neuropatía sensorial y depresión (Gurgel-Giannetti et al., 2012). Además, se han desarrollado modelos animales en los que la ausencia específica en miocardio de alguna de estas proteínas, como TFAM, reproducen un fenotipo de MCD, constatando que éstas son necesarias para la homeostasis del músculo esquelético y para el correcto funcionamiento del músculo cardíaco (Tavi et al., 2005; Hayashi et al., 2006). Por último, se eligió el gen que codifica la proteína AIF, un factor mitocondrial inductor de apoptosis, implicado en la regulación de la respiración mitocondrial a través del complejo I de la CR (Vahsen et al., 2004); teniendo en cuenta, además, que la delección específica de AIF en el músculo esquelético y cardíaco de un modelo animal, provoca un cuadro de disfunción mitocondrial con atrofia del músculo esquelético y MCD (Joza et al., 2005).

En el caso del paciente CM48, portador de la variación m.1628C>T, la caída de la actividad enzimática del complejo I, en biopsia muscular (Arredondo et al., 2012), puede estar asociada a una mutación en genes del ADN nuclear, relacionados con la función del complejo I. Por lo tanto, sería necesario analizar distintos genes implicados en la función de este complejo, en muestras de este paciente. Sin embargo, los 13 genes nucleares elegidos no se analizaron en este paciente, puesto que fue descartado de estos

análisis al haberse encontrado inicialmente la variante m.1628C>T en el genoma mitocondrial. Además, en caso de que se hubiera realizado, sólo se habrían analizado 3 de los genes que codifican subunidades estructurales del complejo I (*NDUFV2*, *NDUFS2*, *NDUFA2*) (Loeffen et al., 2001; Bénit et al., 2003). Como ya se ha mencionado, estas limitaciones del análisis de genes nucleares se deben, principalmente, a la limitada cantidad de muestra biopsiada de que disponemos para cada paciente.

Finalmente, podemos decir que, en caso de sospecha de MCM, se debería secuenciar el ADNmt por completo, sin embargo, no se han encontrado defectos genéticos en un elevado número de los pacientes con MCM-plus. Esto significa que serán necesarios análisis más exhaustivos, como secuenciación de exomas acompañada con validación funcional, para determinar con precisión la causa genética molecular en aquellos pacientes con fenotipo clínico de MCM-plus. La identificación de nuevas mutaciones y genes asociados a la enfermedad, permitirá a los médicos ofrecer mayor asesoramiento genético y a los científicos a investigar terapias más efectivas en el futuro.

2. Evaluación de la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas.

Se desconoce qué subyace a la gran heterogeneidad clínica de la MCH, si bien se considera que está relacionada con su heterogeneidad genética ya que la alteración molecular causante de la enfermedad puede residir en alguno de los múltiples genes que codifican proteínas cardíacas. Actualmente sabemos que, además de las mutaciones en genes mitocondriales, las mutaciones asociadas a esta enfermedad se encuentran en su mayoría en genes que codifican proteínas del sarcómero cardíaco, la unidad funcional contráctil del cardiomiocito. Hasta la fecha, se han identificado mutaciones responsables de MCH en 27 genes nucleares, de los cuales, los genes sarcoméricos MYH7, MYBPC3 y TNNC1 son los más comunes, acumulando alrededor del 70% de los casos (Prinz et al., 2011).

Dado que, previamente no se han descrito ensayos funcionales que permitan evaluar *in vitro* la patogenicidad de nuevas mutaciones en los genes sarcoméricos y, por tanto, determinar si son causantes de MCH, creemos que disponer de un ensayo de estas características permitiría realizar un diagnóstico más preciso en estos pacientes y, en consecuencia, ofrecer al paciente y a sus familiares un mejor seguimiento y tratamiento.

Como se ha mencionado previamente en el estudio García-Pavía et al. (2011), se han analizado los genes sarcoméricos de pacientes con MCH. Entre las alteraciones genéticas documentadas, se identificó una nueva mutación no descrita previamente, p.Gly128Cys en la proteína MYL3, como posible responsable de MCH en uno de estos pacientes. Por tanto, consideramos que la mutación p.Gly128Cys puede ser un excelente candidato para llevar a cabo el ensayo funcional.

2.1. Para desarrollar el ensayo funcional, se seleccionaron las células ES AMPIGX7 de ratón, que tienen capacidad para diferenciarse a cardiomiocitos.

La mayoría de los estudios previos, realizados para analizar la patogenicidad de mutaciones en genes sarcoméricos, se han llevado a cabo en animales transgénicos, como es el caso de los estudios realizados sobre las mutaciones p.Met149Val y p.Gly57Cys en la proteína MYL3 (Sanbe et al., 2000; Muthu et al., 2011). Estos estudios ayudan a comprender los mecanismos patogénicos de las distintas mutaciones encontradas, puesto que en muchos casos la evaluación de la patogenicidad se limita sólo a estudios de pedigree (Lee et al., 2001; Kabaeva et al., 2002; Andersen et al., 2012). Sin embargo, en el caso de la mutación p.Met149Val, otro estudio en conejos transgénicos no ha mostrado evidencias de hipertrofia o cualquier patología cardíaca (James et al., 2002), por lo que, para poder comprender los mecanismos patogénicos de estas mutaciones, es necesario encontrar un modelo de estudio similar al humano. Con un ensayo funcional *in vitro* basado en las células ES de ratón, AMPIGX7, se puede realizar una primera aproximación para evaluar la patogenicidad de las distintas mutaciones.

Para realizar este ensayo funcional *in vitro*, utilizamos las células ES de ratón con capacidad para diferenciarse a cardiomiocitos por el método de las “gotas colgantes”, sobre los cuales se midieron parámetros necesarios para detectar fenotipos relacionados con MCH. Sobre la línea de células ES de ratón CGR8, el grupo de A. Sanchinidis desarrolló la línea AMPIGX7, que expresa, bajo el control del promotor de la cadena alfa de la miosina pesada (*Myh6*), el gen de resistencia a puomicina y la proteína fluorescente eGFP (Akasha et al., 2008). De este modo consiguieron establecer una línea de células ES que se podían diferenciar a cardiomiocitos, los cuales se detectarían fácilmente por expresar eGFP y ser resistentes a puomicina. La resistencia a puomicina permite seleccionar los cardiomiocitos del resto de células para así poder realizar los análisis necesarios.

Para comprobar la patogenicidad de la mutación p.Gly128Cys en la proteína MYL3, se sobreexpresaron, en la línea celular AMPIGX7 la proteína MYL3 silvestre como control y con la mutación p.Gly128Cys. Además se emplearon, como control positivo, las mutaciones en MYL3, p.Met149Val y p.Ala57Gly, con la certeza de que ya se han observado evidencias patológicas en estudios previos de estas mutaciones en ratones (Sanbe et al., 2000; Muthu et al., 2011).

2.2. El fragmento de promotor del gen *MyI3* no dirige la expresión de proteínas en cardiomiocitos a diferencia el fragmento del promotor del gen *Tnni3*.

Tras realizar los experimentos del análisis de expresión de mCherry, dirigida por los promotores de los genes de ratón *Tnni3* y *MyI3*, los resultados mostraron claramente una elevada expresión de mCherry en cardiomiocitos derivados de células ES, estando dirigidos por el promotor de *Tnni3*. Este promotor, además, es idóneo para sobreexpresar distintos genes, gracias al hecho de que solo existe una isoforma

de troponina I cardíaca. Esto evita las posibles regulaciones internas que existirían con otros genes, como la isoforma ventricular *Myl3* y la auricular *Myl4*, que ven regulada su expresión dependiendo del tipo de cardiomiocito y también dependiendo de la concentración de calcio intracelular (Woischwill et al., 2005; Hernandez et al., 2007). Además, la baja expresión de mCherry en las células ES con el promotor de *Tnni3*, antes de ser diferenciadas, evita posibles alteraciones que podrían sufrir las células en el proceso de diferenciación; problema que probablemente habríamos tenido con el fragmento del promotor de *Myl3*. Aún así, aunque no se ha observado una expresión clara de mCherry dirigida por el fragmento de promotor de *Myl3*, no podemos descartar su utilidad para investigaciones futuras.

2.3. Las mutaciones p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val en la proteína MYL3 no generan alteraciones detectables en la estructura del sarcómero.

Como se ha mencionado previamente, la estructura del sarcómero cardíaco puede verse afectada por distintas mutaciones en proteínas sarcoméricas (Dumka et al., 2006; Kraft et al., 2013; Moore et al., 2014). Por ejemplo, en un análisis de la mutación p.Arg723Gly en la cadena pesada de la miosina beta (MYH7) se describieron irregularidades en las líneas Z del sarcómero (Kraft et al., 2013). Además, en otro estudio de varias mutaciones en la troponina T cardíaca (TNNT2) observaron filamentos finos desagregados en las líneas Z, líneas M no visibles y bandas I y A con los bordes irregulares (Moore et al., 2014).

Los resultados obtenidos, tras analizar la estructura del sarcómero por microscopía óptica confocal, mediante el uso del anticuerpo contra MYL3 y tinciones con faloidina, no mostraron ninguna diferencia destacable entre los cardiomiocitos que sobreexpresaban las distintas isoformas de MYL3. Aunque las imágenes obtenidas mediante tinciones con faloidina eran lo suficientemente detalladas, para observar cualquier desajuste, hubiera sido necesario realizar a continuación un análisis por microscopía electrónica.

2.4. No se observaron diferencias en la expresión de las distintas isoformas de MYL3, silvestre y con las mutaciones p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val.

Se analizó la expresión de distintos genes sobre cardiomiocitos derivados de las distintas líneas de células ES. Estos análisis se realizaron para verificar, por un lado la sobreexpresión de *Myl3* y, por otro lado para comprobar la posible patogenicidad de las distintas isoformas, observando su efecto sobre otros genes. Entre estos genes se eligieron los genes sarcoméricos *Myl3*, *Myl4*, *Myh6*, *Myh7* y *Tnni3*. Estos genes pueden ver afectada su expresión en presencia de las mutaciones p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val de *Myl3*, como por ejemplo el gen *Myl4*, que aumenta su expresión en situaciones de

hipertrofia (Hernandez et al., 2007). También se analizó la expresión de los genes *Ctf1*, *Bcl2*, *Nppa* y *Ckmt2*. El gen *Ctf1* codifica la cardiotrofina 1, proteína de la familia de la interleukina 6, que está implicada en el incremento de la proliferación, tamaño de los cardiomiocitos y en procesos de citoprotección; y se ha descrito un aumento de su expresión en situaciones de hipertrofia (Yamauchi-Takihara y Kishimoto, 2000). El gen *Bcl2* codifica una proteína mitocondrial supresora de la apoptosis. Teniendo en cuenta que en la MCH se incrementan los procesos de apoptosis, es interesante analizar la expresión de este gen, y más teniendo en cuenta que sus niveles de expresión se ven incrementados en respuesta a una situación de hipertrofia (Chatterjee et al., 2011). El gen *Nppa* codifica el péptido natriurético auricular y se ha descrito que, en situación de hipertrofia cardíaca, se desajusta la regulación de su expresión (Becker et al., 2012). Para comprobar los distintos cambios metabólicos que puedan acontecer en los cardiomiocitos, se analizó la expresión del gen *Ckmt2*, que codifica la creatina kinasa mitocondrial sarcomérica (Miceli y Jazwinski, 2005).

Sin embargo, al analizar la expresión por RT-qPCR, nuestros datos no eran reproducibles. Por tanto, no pudimos verificar la sobreexpresión de las distintas isoformas del gen *Myl3*, ni sacar conclusiones de la expresión de ninguno de los genes estudiados. La ausencia de reproducibilidad de los datos se debió principalmente a dos motivos:

- En primer lugar, la baja reproducibilidad se debía a las dificultades técnicas de obtención de los distintos cardiomiocitos derivados de células ES, como la disgregación con colagenasa de cuerpos embrioides y la purificación de cardiomiocitos por gradientes de percoll, que sometían a las células a estrés, alterando la calidad del ARNm. Estas dificultades técnicas se podrían haber subsanado parcialmente prolongando el experimento varios días y limitando el estrés al que se sometían los cardiomiocitos.
- En segundo lugar, también afectaban a la reproducibilidad del experimento las distintas proporciones de los distintos tipos celulares de nuestras muestras. Esto se debe principalmente a que, en el proceso de diferenciación, las células ES se diferencian a distintos tipos de cardiomiocitos con distintas características, similares a cardiomiocitos auriculares, ventriculares o a células nodales (Jonsson et al., 2011). La proporción de las distintas poblaciones de cardiomiocitos podría mantenerse en todos los experimentos, sin embargo, la larga duración del proceso de diferenciación (9 días) en el que intervienen varios factores, hace que esta proporción de distintos cardiomiocitos sea muy variable. Entre estos factores se encuentran la matriz en la que están creciendo, la frecuencia del cambio de medio, la densidad de células sembradas, la edad de las células después de iniciar el proceso de diferenciación y el control de la temperatura. En nuestro caso, el limitado control sobre el desarrollo de los distintos cuerpos embrioides y las variaciones incontrolables de temperatura, a las que se someten las células a lo largo del proceso, provocan una gran variabilidad en la proporción de los distintos tipos celulares obtenidos. Algunos autores conscientes de esta variabilidad, emplean métodos de diferenciación con

matrices extracelulares con las que obtienen resultados más robustos en menor tiempo, que con la generación de cuerpo embrioides (Zhang et al., 2012).

2.5. Replanteamiento del abordaje experimental para la evaluación de la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas.

Lamentablemente, mientras se realizaban todos los ajustes necesarios para llevar a cabo la evaluación de la patogenicidad de las distintas isoformas de MYL3, como ajustes en la obtención de una cantidad de cardiomiocitos suficientes, en su purificación, en la obtención de muestras de calidad para RT-qPCR o en el análisis de la estructura del sarcómero, tuvimos que replantearnos el abordaje experimental por diferentes razones, llegando a concluir el abandono del proyecto.

La primera razón y la principal fue que, en un artículo publicado por (Lossie et al., 2012), se describieron ensayos *in vitro*, en los que se analizaba la afinidad de la proteína MYL3, con distintas mutaciones, por un fragmento de la proteína MYH7. Entre estas mutaciones se encontraban dos de las mutaciones que estábamos analizando, p.Ala57Gly y p.Met149Val. Los resultados mostraron que la afinidad de MYL3, con estas dos mutaciones, por el fragmento de MYH7, era significativamente menor comparada con la afinidad de MYL3 silvestre (Lossie et al., 2012). Esto restó importancia a nuestra investigación, habiendo descrito una forma más sencilla de analizar, *in vitro*, la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas. Además, el hecho de demostrar la baja afinidad de MYL3 mutada por la proteína MYH7, indica que las mutaciones p.Ala57Gly y p.Met149Val provocan que la proteína MYL3 no se integre correctamente en el sarcómero, generando una situación de haploinsuficiencia. Esto explicaría por qué en los animales transgénicos no se observó un fenotipo de MCH (Sanbe et al., 2000; James et al., 2002; Muthu et al., 2011), puesto que los cardiomiocitos contienen la cantidad suficiente de la isoforma endógena de MYL3 para cumplir su función. Debido a esto, la carencia generada por estas mutaciones, en condiciones fisiológicas, no se reproduciría en un modelo mediante sobreexpresión. Sin embargo, en los modelos de ratón, generados con estas dos mutaciones, sí se observaron evidencias patológicas (no hipertrofia) (Sanbe et al., 2000; Muthu et al., 2011). Esto podría deberse a que las isoformas mutadas están interaccionando con el sarcómero, causando estos fenotipos patológicos, pero la competencia con la isoforma endógena para unirse al sarcómero impide que se reproduzcan las condiciones fisiológicas para que se desarrolle MCH.

No obstante, no todas las mutaciones en proteínas sarcoméricas causan haploinsuficiencia, como es el caso de las mutaciones p.Arg92Gln y p.Arg92Leu en la proteína TNNT2, que alteran de forma distinta la sensibilidad al calcio del filamento fino (Ford et al., 2012). En este caso, la MCH generada por estas mutaciones se debe a una situación de dominancia negativa y no de haploinsuficiencia. Por tanto, un ensayo similar al realizado por Lossie et al. no permitiría determinar la patogenicidad de este tipo de

mutaciones y si lo haría un ensayo funcional que sobreexpresara las proteínas mutadas como el que aquí se ha descrito.

Teniendo en cuenta las razones mencionadas y que los fenotipos patológicos de estos ratones eran observables tras 7 semanas de desarrollo (Sanbe et al., 2000; Muthu et al., 2011), es probable que no podamos observar ninguna evidencia patológica, en cardiomiocitos derivados de células ES, mediante la sobreexpresión de estas isoformas. Todo esto unido a la baja reproducibilidad de los experimentos de RT-qPCR y al no observar diferencias en el análisis de la estructura sarcomérica, nos hizo concluir que no es viable analizar la patogenicidad de mutaciones en proteínas sarcoméricas mediante este abordaje.

En resumen, en el presente trabajo se han evaluado retrospectivamente 45 historias clínicas de pacientes con un fenotipo MCM-plus, de los cuales se recuperaron muestras de biopsia muscular para su análisis genético. De las muestras se secuenciaron tanto el ADNmt completo como 13 genes codificados en el ADN nuclear, seleccionados por su implicación con MCM, y se encontraron 9 variaciones de secuencia distintas en el ADNmt. Gracias a la utilización de un sistema de híbridos mitocondriales, pudimos evaluar la patogenicidad de 3 de estas variantes: m.7896G>A, m.9448A>G y m.1628C>T. La variante m.7896G>A se clasificó como mutación patogénica, puesto que generaba un defecto claro en el ensamblaje y actividad enzimática del complejo IV. La variante m.9448A>G se clasificó como un polimorfismo puesto que no se observó ningún defecto y las bases de datos la describen como un polimorfismo del haplogrupo K. La variante m.1628C>T se clasificó como un posible factor de riesgo, puesto que, las disminuciones leves en niveles de ATP, ROS y proliferación en galactosa no se pueden relacionar con el fenotipo patológico del paciente y tampoco se puede determinar que sean completamente inocuas. Además, entre las otras 6 variantes encontradas, se clasificaron 2 como posibles polimorfismos (m.12923G>T y m.8519G>A), otras dos como posibles mutaciones patogénicas (m.1291T>C y m.3721A>G) y dos mutaciones patogénicas más: la mutación m.3243G>A asociada a MCM con anterioridad y, gracias a un estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio (Arredondo et al., 2012), se pudo clasificar la mutación m.1644G>A como patogénica. El hecho de haber encontrado estas mutaciones en pacientes con MCM, deja clara la necesidad de realizar mejores exploraciones a los pacientes en busca de miocardiopatías cuando hay sospecha de enfermedad mitocondrial. Por otro lado se realizaron las primeras aproximaciones para implementar un ensayo funcional *in vitro* para evaluar la patogenicidad de proteínas sarcoméricas, sin embargo, al analizar los datos de las mutaciones p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val no se obtuvieron resultados concluyentes y fue necesario replantearse el abordaje experimental. A pesar de nuestros resultados negativos, sigue siendo importante desarrollar un ensayo funcional en células para evaluar la patogenicidad de mutaciones en genes sarcoméricos y comprender los distintos mecanismos en los que intervienen, pudiendo dar así un mejor tratamiento médico a los pacientes y, en determinadas situaciones, poder llegar a prevenir estas enfermedades.

Conclusiones

1. La frecuencia de miocardiopatía mitocondrial, de los diferentes síntomas no cardíacos y el índice de mortalidad, en los pacientes pediátricos representados con enfermedad mitocondrial, son similares a las frecuencias presentadas en estudios previos.
2. Se han identificado 3 mutaciones patogénicas en nuestros pacientes (m.3243A>G en el gen *MT-TL1*, m.1644G>A en el gen *MT-TV* y m.7896G>A en el gen *MT-CO2*) y se ha caracterizado la mutación m.7896G>A causante de un defecto claro en la actividad enzimática y ensamblaje del complejo IV.
3. Se han identificado y caracterizado 2 polimorfismos (m.9448A>G en el gen *MT-CO3* y m.1628C>T en el gen *MT-TV*) de los cuales el polimorfismo m.1628C>T es un posible factor de riesgo causante de una disminución de los niveles de ATP que podría agravar la patología de enfermedades mitocondriales.
4. Las variaciones de secuencia m.1644G>A y m.1628C>T en el mismo gen (*MT-TV*) afectan de forma diferente a la función OXPHOS, m.1644G>A disminuyendo los niveles basales del ARNt-Val y m.1628C>T disminuyendo levemente la síntesis de ATP total y mitocondrial.
5. Se han identificado 2 posibles polimorfismos, m.12923G>T en el gen *MT-ND5* y m.8519G>A en el gen *MT-ATP8*, como variantes de los haplogrupos W e I respectivamente.
6. Se han identificado 2 posibles mutaciones patogénicas, m.1291T>C en el gen *MT-RNR1* y m.3721A>G en el gen *MT-ND1*.
7. No se han detectado diferencias significativas, entre las distintas mutaciones de MYL3 p.Ala57Gly, p.Gly128Cys y p.Met149Val, al analizar la estructura sarcomérica y los niveles de expresión génica en cardiomiocitos derivados de células ES.
8. Los modelos que sobreexpresan proteínas sarcoméricas con mutaciones no reproducen el mismo fenotipo patológico que en condiciones fisiológicas, llegando incluso a enmascarar dicho fenotipo, lo que indica que no es viable realizar un ensayo funcional *in vitro* mediante sobreexpresión, para evaluar la patogenicidad de estas mutaciones.

Bibliografía

- Akasha, A. A., Sotiriadou, I., Doss, M. X., Halbach, M., Winkler, J., Baunach, J. J. S., Katsen-Globa, A., Zimmermann, H., Choo, Y., Hescheler, J. y Sachinidis, A. (2008) 'Entrapment of embryonic stem cells-derived cardiomyocytes in macroporous biodegradable microspheres: preparation and characterization.' *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6) pp. 665–672.
- Andersen, P. S., Hedley, P. L., Page, S. P., Syrris, P., Moolman-Smook, J. C., McKenna, W. J., Elliott, P. M. y Christiansen, M. (2012) 'A novel Myosin essential light chain mutation causes hypertrophic cardiomyopathy with late onset and low expressivity.' *Biochemistry research international*, 2012(Figure 2) p. 685108.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. y Young, I. G. (1981) 'Sequence and organization of the human mitochondrial genome.' *Nature*, 290(5806) pp. 457–65.
- Andreu, A. L., Checcarelli, N., Iwata, S., Shanske, S. y DiMauro, S. (2000) 'A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy.' *Pediatric research*, 48(3) pp. 311–4.
- Andreu, A. L., Martinez, R., Marti, R. y García-Arumí, E. (2009) 'Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors.' *Mitochondrion*, 9(4) pp. 242–6.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. y Howell, N. (1999) 'Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.' *Nature genetics*, 23(2) p. 147.
- Antonicka, H., Leary, S. C., Guercin, G.-H., Agar, J. N., Horvath, R., Kennaway, N. G., Harding, C. O., Jaksch, M. y Shoubbridge, E. A. (2003) 'Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency.' *Human molecular genetics*, 12(20) pp. 2693–702.
- Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C. G., Glerum, D. M., Hoffbuhr, K. C., Leary, S. C., Kennaway, N. G. y Shoubbridge, E. A. (2003) 'Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy.' *American journal of human genetics*, 72(1) pp. 101–14.
- Apte, S. M., Vadhan-Raj, S., Cohen, L., Bassett, R. L., Gordon, I. O., Levenback, C. F., Ramirez, P. T., Gallardo, S. T., Patenia, R. S., Garcia, M. E., Iyer, R. B. y Freedman, R. S. (2006) 'Cytokines, GM-CSF and IFNgamma administered by priming and post-chemotherapy cycling in recurrent ovarian cancer patients receiving carboplatin.' *Journal of translational medicine*, 4, January, p. 16.
- Arbustini, E., Narula, N., Dec, G. W., Reddy, K. S., Greenberg, B., Kushwaha, S., Marwick, T., Pinney, S., Bellazzi, R., Favalli, V., Kramer, C., Roberts, R., Zoghbi, W. a, Bonow, R., Tavazzi, L., Fuster, V. y Narula, J. (2013) 'The MOGE(S) classification for a phenotype-genotype nomenclature of cardiomyopathy: endorsed by the World Heart Federation.' *Journal of the American College of Cardiology*, 62(22) pp. 2046–72.
- Arco, A. Del y Satrústegui, J. (2005) 'New mitochondrial carriers: an overview.' *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(19-20) pp. 2204–27.
- Arpa, J., Cruz-Martínez, A., Campos, Y., Gutiérrez-Molina, M., García-Rio, F., Pérez-Conde, C., Martín, M. A., Rubio, J. C., Del Hoyo, P., Arpa-Fernández, A. and Arenas, J. (2003) 'Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients.' *Muscle & nerve*, 28(6) pp. 690–5.

- Arredondo, J. J., Gallardo, M. E., García-Pavía, P., Domingo, V., Bretón, B., García-Silva, M. T., Sedano, M. J., Martín, M. a, Arenas, J., Cervera, M., Garesse, R. y Bornstein, B. (2012) 'Mitochondrial tRNA valine as a recurrent target for mutations involved in mitochondrial cardiomyopathies.' *Mitochondrion*. Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved, 12(2) pp. 357–62.
- Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O. y Enríquez, J. A. (2012) 'NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain.' *Cell metabolism*, 16(3) pp. 378–86.
- Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A. y Birk, O. S. (2008) 'Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ.' *American journal of human genetics*, 82(5) pp. 1211–6.
- Bates, M. G. D., Bourke, J. P., Giordano, C., d'Amati, G., Turnbull, D. M. y Taylor, R. W. (2012) 'Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management.' *European heart journal*, 33(24) pp. 3023–33.
- Becker, J. R., Robinson, T. Y., Sachidanandan, C., Kelly, A. E., Coy, S., Peterson, R. T. y MacRae, C. A. (2012) 'In vivo natriuretic peptide reporter assay identifies chemical modifiers of hypertrophic cardiomyopathy signalling.' *Cardiovascular research*, 93(3) pp. 463–70.
- Behar, D. M., van Oven, M., Rosset, S., Metspalu, M., Loogväli, E.-L., Silva, N. M., Kivisild, T., Torroni, A. y Villems, R. (2012) 'A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root.' *American journal of human genetics*, 90(4) pp. 675–84.
- Bénit, P., Beugnot, R., Chretien, D., Giurgea, I., De Lonlay-Debeney, P., Issartel, J.-P., Corral-Debrinski, M., Kerscher, S., Rustin, P., Rötig, A. y Munnich, A. (2003) 'Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy.' *Human mutation*, 21(6) pp. 582–6.
- Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G. y Rizzuto, R. (2004) 'Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship.' *Biochimica et biophysica acta*, 1742(1-3) pp. 119–31.
- Blakely, E. L., Poulton, J., Pike, M., Wojnarowska, F., Turnbull, D. M., McFarland, R. y Taylor, R. W. (2004) 'Childhood neurological presentation of a novel mitochondrial tRNA(Val) gene mutation.' *Journal of the neurological sciences*, 225(1-2) pp. 99–103.
- Blankenhorn, M. A. y Gall, E. A. (1956) 'Myocarditis and myocardosis; a clinicopathologic appraisal.' *Circulation*, 13(2) pp. 217–23.
- Bleier, L., Wittig, I., Heide, H., Steger, M., Brandt, U. y Dröse, S. (2015) 'Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species.' *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 78, January, pp. 1–10.
- Boczonadi, V. y Horvath, R. (2014) 'Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease.' *The international journal of biochemistry & cell biology*. Elsevier Ltd, 48, March, pp. 77–84.
- Bogenhagen, D. F. y Clayton, D. A. (2003) 'Concluding remarks: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst.' *Trends in biochemical sciences*, 28(8) pp. 404–5.
- Bogenhagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L. y Kobayashi, R. (2003) 'Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes.' *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2(11) pp. 1205–16.

- Bonawitz, N. D., Clayton, D. A. y Shadel, G. S. (2006) 'Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery.' *Molecular cell*, 24(6) pp. 813–25.
- Bornstein, B., Mas, J. A., Fernández-Moreno, M. A., Campos, Y., Martín, M. A., del Hoyo, P., Rubio, J. C., Arenas, J. y Garesse, R. (2002) 'The A8296G mtDNA mutation associated with several mitochondrial diseases does not cause mitochondrial dysfunction in cybrid cell lines.' *Human mutation*, 19(3) pp. 234–9.
- Bornstein, B., Mas, J. A., Patrono, C., Fernández-Moreno, M. A., González-Vioque, E., Campos, Y., Carrozzo, R., Martín, M. A., del Hoyo, P., Santorelli, F. M., Arenas, J. y Garesse, R. (2005) 'Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene.' *The Biochemical journal*, 387(Pt 3) pp. 773–8.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., Munnich, A. y Rötig, A. (1995) 'Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency.' *Nature genetics*, 11(2) pp. 144–9.
- Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A. y Holt, I. J. (2003) 'Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone.' *The Journal of biological chemistry*, 278(51) pp. 50961–9.
- Brand, M. D. y Esteves, T. C. (2005) 'Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3.' *Cell metabolism*, 2(2) pp. 85–93.
- Brigden, W. (1957) 'Uncommon myocardial diseases; the non-coronary cardiomyopathies.' *Lancet*, 273(7007) pp. 1179–84.
- Brito, D., Miltenberger-Miltenyi, G., Vale Pereira, S., Silva, D., Diogo, A. N. y Madeira, H. (2012) 'Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: genetic profile in a Portuguese population.' *Revista portuguesa de cardiologia : órgão oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology*, 31(9) pp. 577–87.
- Calvo, S. E., Tucker, E. J., Compton, A. G., Kirby, D. M., Crawford, G., Burt, N. P., Rivas, M., Guiducci, C., Bruno, D. L., Goldberger, O. A., Redman, M. C., Wiltshire, E., Wilson, C. J., Altshuler, D., Gabriel, S. B., Daly, M. J., Thorburn, D. R. y Mootha, V. K. (2010) 'High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency.' *Nature genetics*, 42(10) pp. 851–8.
- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S. A., Chang, B., Goldberger, O. A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S. A. y Mootha, V. K. (2006) 'Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics.' *Nature genetics*, 38(5) pp. 576–82.
- Campos, Y., García-Redondo, A., Fernández-Moreno, M. A., Martínez-Pardo, M., Goda, G., Rubio, J. C., Martín, M. A., del Hoyo, P., Cabello, A., Bornstein, B., Garesse, R. y Arenas, J. (2001) 'Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene.' *Annals of neurology*, 50(3) pp. 409–13.
- Cannon, B. y Nedergaard, J. (2004) 'Brown adipose tissue: function and physiological significance.' *Physiological reviews*, 84(1) pp. 277–359.
- Carrozzo, R., Rizza, T., Stringaro, A., Pierini, R., Mormone, E., Santorelli, F. M., Malorni, W. y Matarrese, P. (2004) 'Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis.' *Journal of neurochemistry*, 90(2) pp. 490–501.

- Cha, M.-Y., Kim, D. K. y Mook-Jung, I. (2015) 'The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases.' *Experimental & molecular medicine*. Nature Publishing Group, 47(3) p. e150.
- Chalmers, R. M., Lamont, P. J., Nelson, I., Ellison, D. W., Thomas, N. H., Harding, A. E. y Hammans, S. R. (1997) 'A mitochondrial DNA tRNA(Val) point mutation associated with adult-onset Leigh syndrome.' *Neurology*, 49(2) pp. 589–92.
- Chan, D. C. (2006) 'Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development.' *Cell*, 125(7) pp. 1241–52.
- Chang, A. N. y Potter, J. D. (2005) 'Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy.' *Heart failure reviews*, 10(3) pp. 225–35.
- Charron, P. y Komajda, M. (2006) 'Molecular genetics in hypertrophic cardiomyopathy: towards individualized management of the disease.' *Expert review of molecular diagnostics*, 6(1) pp. 65–78.
- Chatterjee, A., Mir, S. A., Dutta, D., Mitra, A., Pathak, K. y Sarkar, S. (2011) 'Analysis of p53 and NF-κB signaling in modulating the cardiomyocyte fate during hypertrophy.' *Journal of cellular physiology*, 226(10) pp. 2543–54.
- Chen, H. y Chan, D. C. (2005) 'Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission.' *Human molecular genetics*, 14 Spec No, October, pp. R283–9.
- Chen, X. J. y Butow, R. A. (2005) 'The organization and inheritance of the mitochondrial genome.' *Nature reviews. Genetics*, 6(11) pp. 815–25.
- Clayton, D. A. (1982) 'Replication of animal mitochondrial DNA.' *Cell*, 28(4) pp. 693–705.
- Coller, H. A., Khrapko, K., Bodyak, N. D., Nekhaeva, E., Herrero-Jimenez, P. y Thilly, W. G. (2001) 'High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection.' *Nature genetics*, 28(2) pp. 147–50.
- De Coo, I. F., Sistermans, E. A., de Wijs, I. J., Catsman-Berrevoets, C., Busch, H. F., Scholte, H. R., de Klerk, J. B., van Oost, B. A. y Smeets, H. J. (1998) 'A mitochondrial tRNA(Val) gene mutation (G1642A) in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes.' *Neurology*, 50(1) pp. 293–5.
- D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Lin, M. T., Mauck, W. M., Shao, L. Z., Lenaz, G., Moraes, C. T. y Manfredi, G. (2004) 'Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells.' *Human molecular genetics*, 13(24) pp. 3171–9.
- Darin, N., Oldfors, A., Moslemi, A. R., Holme, E. y Tulinius, M. (2001) 'The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities.' *Annals of neurology*, 49(3) pp. 377–83.
- Debray, F.-G., Lambert, M., Chevalier, I., Robitaille, Y., Decarie, J.-C., Shoubbridge, E. A., Robinson, B. H. y Mitchell, G. A. (2007) 'Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases.' *Pediatrics*, 119(4) pp. 722–33.
- Desouki, M. M., Kulawiec, M., Bansal, S., Das, G. y Singh, K. K. (2005) 'Cross Talk Between Mitochondria and Superoxide Generating NADPH Oxidase in Breast and Ovarian Tumors ND ES SC ABBREVIATIONS KEY WORDS,' (December) pp. 1367–1373.

- Detmer, S. A. y Chan, D. C. (2007) 'Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics.' *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11) pp. 870–9.
- Dimauro, S. (2004) 'Mitochondrial medicine.' *Biochimica et biophysica acta*, 1659(2-3) pp. 107–14.
- DiMauro, S., Hirano, M. y Schon, E. A. (2006) 'Approaches to the treatment of mitochondrial diseases.' *Muscle & Nerve*, 34(3) pp. 265–283.
- DiMauro, S. y Schon, E. A. (2003) 'Mitochondrial respiratory-chain diseases.' *The New England journal of medicine*, 348(26) pp. 2656–68.
- Driest, S. L. Van, Ommen, S. R., Tajik, A. J., Gersh, B. J. y Ackerman, M. J. (2005) 'Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy.' *Mayo Clin Proc*, 80(4) pp. 463–469.
- Driest, S. L. Van, Vasile, V. C., Ommen, S. R., Will, M. L., Tajik, A. J., Gersh, B. J. y Ackerman, M. J. (2004) 'Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy.' *J Am Coll Cardiol*, 44(9) pp. 1903–1910.
- Dumka, D., Talent, J., Akopova, I., Guzman, G., Szczesna-Cordary, D. y Borejdo, J. (2006) 'E22K mutation of RLC that causes familial hypertrophic cardiomyopathy in heterozygous mouse myocardium: effect on cross-bridge kinetics.' *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(5) pp. H2098–106.
- Dunbar, D. R., Moonie, P. A., Jacobs, H. T. y Holt, I. J. (1995) 'Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14) pp. 6562–6.
- E, L.-L., Zhao, Y.-S., Guo, X.-M., Wang, C.-Y., Jiang, H., Li, J., Duan, C.-M. y Song, Y. (2006) 'Enrichment of cardiomyocytes derived from mouse embryonic stem cells.' *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 25(6) pp. 664–74.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G. y Gustafsson, C. M. (2007) 'DNA replication and transcription in mammalian mitochondria.' *Annual review of biochemistry*, 76, January, pp. 679–99.
- Fernández-Vizarra, E., Tiranti, V. y Zeviani, M. (2009) 'Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects.' *Biochimica et biophysica acta*, 1793(1) pp. 200–11.
- Filosto, M., Mancuso, M., Vives-Bauza, C., Vilà, M. R., Shanske, S., Hirano, M., Andreu, A. L. y DiMauro, S. (2003) 'Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies.' *Annals of neurology*, 54(4) pp. 524–6.
- Finsterer, J. (2009) 'Cardiogenetics, neurogenetics, and pathogenetics of left ventricular hypertrabeculation/noncompaction.' *Pediatric cardiology*, 30(5) pp. 659–81.
- Ford, S. J., Mamidi, R., Jimenez, J., Tardiff, J. C. y Chandra, M. (2012) 'Effects of R92 mutations in mouse cardiac troponin T are influenced by changes in myosin heavy chain isoform.' *Journal of molecular and cellular cardiology*, 53(4) pp. 542–51.
- Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L. y Cuezva, J. M. C. (2012) 'The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response.' *Molecular Cell*. 2012/02/22 ed., 45(6) pp. 731–742.

- García-Cazorla, A., De Lonlay, P., Nassogne, M. C., Rustin, P., Touati, G. y Saudubray, J. M. (2005) 'Long-term follow-up of neonatal mitochondrial cytopathies: a study of 57 patients.' *Pediatrics*, 116(5) pp. 1170–7.
- García-Pavia, P., Vázquez, M. E., Segovia, J., Salas, C., Avellana, P., Gómez-Bueno, M., Vilches, C., Gallardo, M. E., Garesse, R., Molano, J., Bornstein, B. y Alonso-Pulpon, L. (2011) 'Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy.' *European journal of heart failure*, 13(11) pp. 1193–1201.
- Garesse, R. y Vallejo, C. G. (2001) 'Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes.' *Gene*, 263(1-2) pp. 1–16.
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G. y Gustafsson, C. M. (2004) 'The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells.' *The EMBO journal*, 23(23) pp. 4606–14.
- Gasparre, G., Porcelli, A. M., Lenaz, G. y Romeo, G. (2013) 'Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development.' *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013/02/05 ed., 5(2).
- Ghezzi, D., Baruffini, E., Haack, T. B., Invernizzi, F., Melchionda, L., Dallabona, C., Strom, T. M., Parini, R., Burlina, A. B., Meitinger, T., Prokisch, H., Ferrero, I. y Zeviani, M. (2012) 'Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis.' *American journal of human genetics*, 90(6) pp. 1079–87.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J. y Van Broeckhoven, C. (2001) 'Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions.' *Nature genetics*, 28(3) pp. 211–2.
- Goodwin, J. F. y Oakley, C. M. (1972) 'The cardiomyopathies.' *British heart journal*, 34(6) pp. 545–52.
- Green, D. R. (2005) 'Apoptotic pathways: ten minutes to dead.' *Cell*, 121(5) pp. 671–4.
- Guerrero, L., Marco-Ferreres, R., Serrano, A. L., Arredondo, J. J. y Cervera, M. (2010) 'Secondary enhancers synergise with primary enhancers to guarantee fine-tuned muscle gene expression.' *Dev Biol*, 337(1) pp. 16–28.
- Gurgel-Giannetti, J., Camargos, S. T., Cardoso, F., Hirano, M. y DiMauro, S. (2012) 'POLG1 Arg953Cys mutation: expanded phenotype and recessive inheritance in a Brazilian family.' *Muscle & nerve*, 45(3) pp. 453–4.
- Haack, T. B., Danhauser, K., Haberberger, B., Hoser, J., Strecker, V., Boehm, D., Uziel, G., Lamantea, E., Invernizzi, F., Poulton, J., Rolinski, B., Iuso, A., Biskup, S., Schmidt, T., Mewes, H.-W., Wittig, I., Meitinger, T., Zeviani, M. y Prokisch, H. (2010) 'Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency.' *Nature genetics*, 42(12) pp. 1131–4.
- Haack, T. B., Kopajtich, R., Freisinger, P., Wieland, T., Rorbach, J., Nicholls, T. J., Baruffini, E., Walther, A., Danhauser, K., Zimmermann, F. A., Husain, R. A., Schum, J., Mundy, H., Ferrero, I., Strom, T. M., Meitinger, T., Taylor, R. W., Minczuk, M., Mayr, J. A. y Prokisch, H. (2013) 'ELAC2 mutations cause a mitochondrial RNA processing defect associated with hypertrophic cardiomyopathy.' *American journal of human genetics*, 93(2) pp. 211–23.
- Hagström, E., Freyer, C., Battersby, B. J., Stewart, J. B. y Larsson, N.-G. (2014) 'No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline.' *Nucleic acids research*, 42(2) pp. 1111–6.

- Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J. M., Boutron, A., Legrand, A. y Slama, A. (2003) 'A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis.' *Human genetics*, 113(2) pp. 118–22.
- Hayashi, M., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Wood, M., Fearn, C., Tatake, R. J. y Lee, J.-D. (2006) 'A crucial role of mitochondrial Hsp40 in preventing dilated cardiomyopathy.' *Nature medicine*, 12(1) pp. 128–32.
- Hernandez, O. M., Jones, M., Guzman, G. y Szczesna-Cordary, D. (2007) 'Myosin essential light chain in health and disease.' *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(4) pp. H1643–54.
- Hoefs, S. J. G., Dieteren, C. E. J., Distelmaier, F., Janssen, R. J. R. J., Epplen, A., Swarts, H. G. P., Forkink, M., Rodenburg, R. J., Nijtmans, L. G., Willems, P. H., Smeitink, J. A. M. y van den Heuvel, L. P. (2008) 'NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease.' *American journal of human genetics*, 82(6) pp. 1306–15.
- Hollingsworth, K. G., Gorman, G. S., Trenell, M. I., McFarland, R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., MacGowan, G. A., Blamire, A. M. y Chinnery, P. F. (2012) 'Cardiomyopathy is common in patients with the mitochondrial DNA m.3243A>G mutation and correlates with mutation load.' *Neuromuscular disorders : NMD*, 22(7) pp. 592–6.
- Holmgren, D., Wåhlander, H., Eriksson, B. O., Oldfors, A., Holme, E. y Tulinius, M. (2003) 'Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings.' *European heart journal*, 24(3) pp. 280–8.
- Holt, I. J., Harding, A. E. y Morgan-Hughes, J. A. (1988) 'Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies.' *Nature*, 331(6158) pp. 717–9.
- Holt, I. J. y Jacobs, H. T. (2003) 'Response: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst.' *Trends in biochemical sciences*, 28(7) pp. 355–6.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E. y Jacobs, H. T. (2000) 'Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA.' *Cell*, 100(5) pp. 515–24.
- Horváth, R., Bender, A., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Czermin, B., Trips, T., Schneiderat, P., Lochmüller, H. y Klopstock, T. (2009) 'Heteroplasmic mutation in the anticodon-stem of mitochondrial tRNA(Val) causing MNGIE-like gastrointestinal dysmotility and cachexia.' *Journal of neurology*, 256(5) pp. 810–5.
- Hughes, S. E. y McKenna, W. J. (2005) 'New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy.' *Heart (British Cardiac Society)*, 91(2) pp. 257–64.
- Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y. y Hayashi, J.-I. (2008) 'ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis.' *Science (New York, N.Y.)*, 320(5876) pp. 661–4.
- Jacoby, D. y McKenna, W. J. (2012) 'Genetics of inherited cardiomyopathy.' *European heart journal*, 33(3) pp. 296–304.
- Jaksch, M., Ogilvie, I., Yao, J., Kortenhaus, G., Bresser, H. G., Gerbitz, K. D. y Shoubridge, E. A. (2000) 'Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency.' *Human molecular genetics*, 9(5) pp. 795–801.

James, J., Zhang, Y., Wright, K., Witt, S., Glascock, E., Osinska, H., Klevitsky, R., Martin, L., Yager, K., Sanbe, A. y Robbins, J. (2002) 'Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy.' *J Mol Cell Cardiol*, 34(7) pp. 873–882.

Jonckheere, A. I., Hogeveen, M., Nijtmans, L. G. J., van den Brand, M. A. M., Janssen, A. J. M., Diepstra, J. H. S., van den Brandt, F. C. A., van den Heuvel, L. P., Hol, F. A., Hofste, T. G. J., Kapusta, L., Dillmann, U., Shamdeen, M. G., Smeitink, J. A. M. y Rodenburg, R. J. T. (2008) 'A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy.' *Journal of medical genetics*, 45(3) pp. 129–33.

Jonsson, M. K. B., Wang, Q.-D. y Becker, B. (2011) 'Impedance-based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes.' *Assay and drug development technologies*, 9(6) pp. 589–99.

Jordens, E. Z., Palmieri, L., Huizing, M., van den Heuvel, L. P., Sengers, R. C. A., Dörner, A., Ruitenbeek, W., Trijbels, F. J., Valsson, J., Sigfusson, G., Palmieri, F. y Smeitink, J. A. M. (2002) 'Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome.' *Annals of neurology*, 52(1) pp. 95–9.

Joza, N., Oudit, G. Y., Brown, D., Bénit, P., Kassiri, Z., Vahsen, N., Benoit, L., Patel, M. M., Nowikovsky, K., Vassault, A., Backx, P. H., Wada, T., Kroemer, G., Rustin, P. y Penninger, J. M. (2005) 'Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy.' *Molecular and cellular biology*, 25(23) pp. 10261–72.

Kabaeva, Z. T., Perrot, A., Wolter, B., Dietz, R., Cardim, N., Correia, J. M., Schulte, H. D., Aldashev, A. A., Mirrahimov, M. M. y Osterziel, K. J. (2002) 'Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy.' *European journal of human genetics : EJHG*, 10(11) pp. 741–8.

Kaguni, L. S. (2004) 'DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase.' *Annual review of biochemistry*, 73, January, pp. 293–320.

Kassem, H. S., Azer, R. S., Saber-Ayad, M., Ayad, M. S., Moharem-Elgamal, S., Magdy, G., Elguindy, A., Cecchi, F., Olivotto, I. y Yacoub, M. H. (2013) 'Early results of sarcomeric gene screening from the Egyptian National BA-HCM Program.' *Journal of cardiovascular translational research*, 6(1) pp. 65–80.

Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttälä, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keränen, S., Peltonen, L. y Suomalainen, A. (2000) 'Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance.' *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480) pp. 782–5.

Kemp, J. P., Smith, P. M., Pyle, A., Neeve, V. C. M., Tuppen, H. A. L., Schara, U., Talim, B., Topaloglu, H., Holinski-Feder, E., Abicht, A., Czermin, B., Lochmüller, H., McFarland, R., Chinnery, P. F., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Lightowlers, R. N., Taylor, R. W. y Horvath, R. (2011) 'Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency.' *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 1) pp. 183–95.

Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M. y Haussler, D. (2002) 'The human genome browser at UCSC.' *Genome Res*, 12(6) pp. 996–1006.

King, M. P. y Attardi, G. (1989) 'Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation.' *Science (New York, N.Y.)*, 246(4929) pp. 500–3.

Kirkinezos, I. G. y Moraes, C. T. (2001) 'Reactive oxygen species and mitochondrial diseases.' *Seminars in cell & developmental biology*, 12(6) pp. 449–57.

Klaassen, S., Probst, S., Oechslin, E., Gerull, B., Krings, G., Schuler, P., Greutmann, M., Hürlimann, D., Yegitbasi, M., Pons, L., Gramlich, M., Drenckhahn, J.-D., Heuser, A., Berger, F., Jenni, R. y Thierfelder, L. (2008) 'Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction.' *Circulation*, 117(22) pp. 2893–901.

Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M. y Falkenberg, M. (2004) 'Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro.' *The EMBO journal*, 23(12) pp. 2423–9.

Kraft, T., Witjas-Paalberends, E. R., Boontje, N. M., Tripathi, S., Brandis, A., Montag, J., Hodgkinson, J. L., Francino, A., Navarro-Lopez, F., Brenner, B., Stienen, G. J. M. y van der Velden, J. (2013) 'Familial hypertrophic cardiomyopathy: functional effects of myosin mutation R723G in cardiomyocytes.' *Journal of molecular and cellular cardiology*, 57, April, pp. 13–22.

Kraytsberg, Y., Schwartz, M., Brown, T. A., Ebraldise, K., Kunz, W. S., Clayton, D. A., Vissing, J. y Khrapko, K. (2004) 'Recombination of human mitochondrial DNA.' *Science (New York, N.Y.)*, 304(5673) p. 981.

Kulawiec, M., Owens, K. M. y Singh, K. K. (2009) 'mtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice.' *Journal of human genetics*. Nature Publishing Group, 54(11) pp. 647–54.

Kurland, C. G. y Andersson, S. G. (2000) 'Origin and evolution of the mitochondrial proteome.' *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64(4) pp. 786–820.

Larsson, N. G. y Rustin, P. (2001) 'Animal models for respiratory chain disease.' *Trends in molecular medicine*, 7(12) pp. 578–81.

Lee, W., Hwang, T. H., Kimura, A., Park, S. W., Satoh, M., Nishi, H., Harada, H., Toyama, J. and Park, J. E. (2001) 'Different expressivity of a ventricular essential myosin light chain gene Ala57Gly mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy.' *Am Heart J*, 141(2) pp. 184–189.

Lenaz, G., Baracca, A., Carelli, V., D'Aurelio, M., Sgarbi, G. y Solaini, G. (2004) 'Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations.' *Biochim Biophys Acta*. 2004/07/30 ed., 1658(1-2) pp. 89–94.

Lev, D., Nissenkorn, A., Leshinsky-Silver, E., Sadeh, M., Zeharia, A., Garty, B.-Z., Blieden, L., Barash, V. y Lerman-Sagie, T. (2004) 'Clinical presentations of mitochondrial cardiomyopathies.' *Pediatric cardiology*, 25(5) pp. 443–50.

Lim, B. C., Park, J. D., Hwang, H., Kim, K. J., Hwang, Y. S., Chae, J.-H., Cheon, J.-E., Kim, I. O., Lee, R. y Moon, H. K. (2009) 'Mutations in ND subunits of complex I are an important genetic cause of childhood mitochondrial encephalopathies.' *Journal of child neurology*, 24(7) pp. 828–32.

Lisi, R. Di, Millino, C., Calabria, E., Altruda, F., Schiaffino, S., Ausoni, S. y Di Lisi, R. (1998) 'Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo.' *J Biol Chem*, 273(39) pp. 25371–25380.

Loeffen, J., Elpeleg, O., Smeitink, J., Smeets, R., Stöckler-Ipsiroglu, S., Mandel, H., Sengers, R., Trijbels, F. y van den Heuvel, L. (2001) 'Mutations in the complex I NDUF2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy.' *Annals of neurology*, 49(2) pp. 195–201.

Lossie, J., Ushakov, D. S., Ferenczi, M. A., Werner, S., Keller, S., Haase, H. y Morano, I. (2012) 'Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting.' *Cardiovascular research*, 93(3) pp. 390–6.

- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L. y Afzelius, B. (1962) 'A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study.' *The Journal of clinical investigation*, 41, September, pp. 1776–804.
- Majamaa-Voltti, K., Peuhkurinen, K., Kortelainen, M.-L., Hassinen, I. E. y Majamaa, K. (2002) 'Cardiac abnormalities in patients with mitochondrial DNA mutation 3243A>G.' *BMC cardiovascular disorders*, 2, August, p. 12.
- Malfatti, E., Laforêt, P., Jardel, C., Stojkovic, T., Behin, A., Eymard, B., Lombès, A., Benmalek, A., Bécane, H.-M., Berber, N., Meune, C., Duboc, D. y Wahbi, K. (2013) 'High risk of severe cardiac adverse events in patients with mitochondrial m.3243A>G mutation.' *Neurology*, 80(1) pp. 100–5.
- Man, P. Y. W., Griffiths, P. G., Brown, D. T., Howell, N., Turnbull, D. M. y Chinnery, P. F. (2003) 'The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England.' *American journal of human genetics*, 72(2) pp. 333–9.
- Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., Eriksson, S. y Cohen, N. (2001) 'The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA.' *Nature genetics*, 29(3) pp. 337–41.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G. y Genova, M. L. (2013) 'Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I.' *Antioxid Redox Signal*. 2013/04/16 ed.
- Margulis, L. (1975) 'Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof.' *Symposia of the Society for Experimental Biology*, (29) January, pp. 21–38.
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A. J., Seidman, C. E., Young, J. B., Association, A. H., Council on Clinical Cardiology, H. F., Committee, T., of Care, Q., Research, O., Genomics, F., Groups, T. B. I. W., on Epidemiology, C. y Prevention (2006) 'Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functio.' *Circulation*, 113(14) pp. 1807–16.
- Martínez-Reyes, I. y Cuezva, J. M. (2014) 'The H⁺-ATP synthase: A gate to ROS-mediated cell death or cell survival.' *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. pp. 1099–1112.
- Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P. y Zeviani, M. (2008) 'Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase.' *American journal of human genetics*, 82(6) pp. 1281–9.
- Masucci, J. P., Davidson, M., Koga, Y., Schon, E. A. y King, M. P. (1995) 'In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys)gene: two genotypes produce similar phenotypes.' *Molecular and cellular biology*, 15(5) pp. 2872–81.
- Mayr, J. A., Havlickova, V., Zimmermann, F., Magler, I., Kaplanova, V., Jesina, P., Pecinova, A., Nuskova, H., Koch, J., Sperl, W. y Houstek, J. (2010) 'Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 subunit.' *Human Molecular Genetics*, 19(17) pp. 3430–3439.
- McFarland, R., Clark, K. M., Morris, A. A. M., Taylor, R. W., Macphail, S., Lightowlers, R. N. y Turnbull, D. M. (2002) 'Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation.' *Nature genetics*, 30(2) pp. 145–6.

- McKenzie, M., Liolitsa, D., Akinshina, N., Campanella, M., Sisodiya, S., Hargreaves, I., Nirmalanathan, N., Sweeney, M. G., Abou-Sleiman, P. M., Wood, N. W., Hanna, M. G. y Duchon, M. R. (2007) 'Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption.' *The Journal of biological chemistry*, 282(51) pp. 36845–52.
- McKinney, E. A. y Oliveira, M. T. (2013) 'Replicating animal mitochondrial DNA.' *Genetics and molecular biology*, 36(3) pp. 308–15.
- Miceli, M. V y Jazwinski, S. M. (2005) 'Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction.' *Experimental cell research*, 302(2) pp. 270–80.
- Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., HersHKovitz, E. y Elpeleg, O. (2004) 'Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation.' *Annals of neurology*, 56(5) pp. 734–8.
- Montoya, J., Ojala, D. y Attardi, G. (1981) 'Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs.' *Nature*, 290(5806) pp. 465–70.
- Moore, R. K., Abdullah, S. y Tardiff, J. C. (2014) 'Allosteric effects of cardiac troponin TNT1 mutations on actomyosin binding: a novel pathogenic mechanism for hypertrophic cardiomyopathy.' *Archives of biochemistry and biophysics*, 552-553, June, pp. 21–8.
- Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Arenas, J., Barrientos, A. y Ugalde, C. (2012) 'Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly.' *Cell metabolism*, 15(3) pp. 324–35.
- Morimoto, S. (2009) 'Expanded spectrum of gene causing both hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy.' *Circulation research*, 105(4) pp. 313–5.
- Muller, F. L., Liu, Y. y Van Remmen, H. (2004) 'Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane.' *The Journal of biological chemistry*, 279(47) pp. 49064–73.
- Muthu, P., Wang, L., Yuan, C.-C., Kazmierczak, K., Huang, W., Hernandez, O. M., Kawai, M., Irving, T. C. y Szczesna-Cordary, D. (2011) 'Structural and functional aspects of the myosin essential light chain in cardiac muscle contraction.' *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(12) pp. 4394–405.
- Nass, M. M. y Nass, S. (1963) 'INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. I. FIXATION AND ELECTRON STAINING REACTIONS.' *The Journal of cell biology*, 19, December, pp. 593–611.
- Naviaux, R. K. y Nguyen, K. V (2004) 'POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion.' *Annals of neurology*, 55(5) pp. 706–12.
- Nijtmans, L. G. J., Henderson, N. S. y Holt, I. J. (2002) 'Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes.' *Methods*, 26(4) pp. 327–34.
- Nishino, I., Spinazzola, A. y Hirano, M. (1999) 'Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder.' *Science (New York, N.Y.)*, 283(5402) pp. 689–92.
- Ogilvie, I., Kennaway, N. G. y Shoubridge, E. A. (2005) 'A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy.' *The Journal of clinical investigation*, 115(10) pp. 2784–92.

- Olson, T. M., Michels, V. V., Thibodeau, S. N., Tai, Y. S. y Keating, M. T. (1998) 'Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure.' *Science (New York, N.Y.)*, 280(5364) pp. 750–2.
- Van Oven, M., van den Tempel, N. y Kayser, M. (2012) 'A multiplex SNP assay for the dissection of human Y-chromosome haplogroup O representing the major paternal lineage in East and Southeast Asia.' *Journal of human genetics*, 57(1) pp. 65–9.
- Palecek, T., Tesarova, M., Kuchynka, P., Dytrych, V., Elleder, M., Hulkova, H., Hansikova, H., Honzik, T., Zeman, J. y Linhart, A. (2012) 'Hypertrophic cardiomyopathy due to the mitochondrial DNA mutation m.3303C>T diagnosed in an adult male.' *International heart journal*, 53(6) pp. 383–7.
- Pallotti, F., Baracca, A., Hernandez-Rosa, E., Walker, W. F., Solaini, G., Lenaz, G., Melzi D'Eril, G. V., Dimauro, S., Schon, E. A. y Davidson, M. M. (2004) 'Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations.' *The Biochemical journal*, 384(Pt 2) pp. 287–93.
- Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., Ferrero, I. y Zeviani, M. (2005) 'Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy.' *Human molecular genetics*, 14(20) pp. 3079–88.
- Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D. C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S. y Schon, E. A. (1999) 'Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene.' *Nature genetics*, 23(3) pp. 333–7.
- Pastores, G. M., Santorelli, F. M., Shanske, S., Gelb, B. D., Fyfe, B., Wolfe, D. y Willner, J. P. (1994) 'Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a mitochondrial DNA point mutation (T8993G).' *American journal of medical genetics*, 50(3) pp. 265–71.
- Poulton, J. y Marchington, D. R. (2002) 'Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications.' *Reproduction (Cambridge, England)*, 123(6) pp. 751–5.
- Da Pozzo, P., Cardaioli, E., Malfatti, E., Gallus, G. N., Malandrini, A., Gaudiano, C., Berti, G., Invernizzi, F., Zeviani, M. y Federico, A. (2009) 'A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Pro) gene associated with late-onset ataxia, retinitis pigmentosa, deafness, leukoencephalopathy and complex I deficiency.' *European journal of human genetics : EJHG*, 17(8) pp. 1092–6.
- Prasad, G. N., Vanniarajan, A., Emmanuel, C., Cherian, K. M., Singh, L. y Thangaraj, K. (2006) 'Novel mitochondrial DNA mutations in a rare variety of hypertrophic cardiomyopathy.' *International journal of cardiology*, 109(3) pp. 432–3.
- Prinz, C., Farr, M., Hering, D., Horstkotte, D. y Faber, L. (2011) 'The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy.' *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(13) pp. 209–15.
- Probst, S., Oechslin, E., Schuler, P., Greutmann, M., Boyé, P., Knirsch, W., Berger, F., Thierfelder, L., Jenni, R. y Klaassen, S. (2011) 'Sarcomere gene mutations in isolated left ventricular noncompaction cardiomyopathy do not predict clinical phenotype.' *Circulation. Cardiovascular genetics*, 4(4) pp. 367–74.
- Rampazzo, A., Nava, A., Malacrida, S., Beffagna, G., Bauce, B., Rossi, V., Zimbello, R., Simionati, B., Basso, C., Thiene, G., Towbin, J. A. y Danieli, G. A. (2002) 'Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.' *American journal of human genetics*, 71(5) pp. 1200–6.

- Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Benaiche, A., Isnard, R., Dubourg, O., Burban, M., Gueffet, J.-P., Millaire, A., Desnos, M., Schwartz, K., Hainque, B., Komajda, M. and Project, E. U. R. O. G. E. N. E. H. F. (2003) 'Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy.' *Circulation*, 107(17) pp. 2227–2232.
- Rosca, M. G. y Hoppel, C. L. (2013) 'Mitochondrial dysfunction in heart failure.' *Heart failure reviews*, 18(5) pp. 607–22.
- Rötig, A. y Munnich, A. (2003) 'Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders.' *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14(12) pp. 2995–3007.
- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S. y Elpeleg, O. (2001) 'Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy.' *Nature genetics*, 29(3) pp. 342–4.
- Sabharwal, S. S. y Schumacker, P. T. (2014) 'Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?' *Nature Reviews Cancer*, 14(11) pp. 709–721.
- Sacconi, S., Salvati, L., Gooch, C., Bonilla, E., Shanske, S. y DiMauro, S. (2002) 'Complex neurologic syndrome associated with the G1606A mutation of mitochondrial DNA.' *Archives of neurology*, 59(6) pp. 1013–5.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1*. CSHL Press.
- Sanbe, A., Nelson, D., Gulick, J., Setser, E., Osinska, H., Wang, X., Hewett, T. E., Klevitsky, R., Hayes, E., Warshaw, D. M. y Robbins, J. (2000) 'In vivo analysis of an essential myosin light chain mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy.' *Circ Res*, 87(4) pp. 296–302.
- Santorelli, F. M., Tanji, K., Manta, P., Casali, C., Krishna, S., Hays, A. P., Mancini, D. M., DiMauro, S. y Hirano, M. (1999) 'Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation.' *American journal of human genetics*, 64(1) pp. 295–300.
- Scaglia, F. (2004) 'Clinical Spectrum, Morbidity, y Mortality in 113 Pediatric Patients With Mitochondrial Disease.' *PEDIATRICS*, 114(4) pp. 925–931.
- Schaefer, A. M., McFarland, R., Blakely, E. L., He, L., Whittaker, R. G., Taylor, R. W., Chinnery, P. F. y Turnbull, D. M. (2008) 'Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults.' *Annals of neurology*, 63(1) pp. 35–9.
- Schapira, A. H. V (2006) 'Mitochondrial disease.' *Lancet*, 368(9529) pp. 70–82.
- Scheffler, I. E. (1999) *Mitochondria*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Scheffler, I. E. (2001) 'Mitochondria make a come back.' *Advanced drug delivery reviews*, 49(1-2) pp. 3–26.
- Schlame, M., Towbin, J. A., Heerdt, P. M., Jehle, R., DiMauro, S. y Blanck, T. J. J. (2002) 'Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome.' *Annals of neurology*, 51(5) pp. 634–7.
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S. y Chen, C. (2008) 'Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA.' *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(1) pp. 31–8.

Schwartz, M. y Vissing, J. (2002) 'Paternal inheritance of mitochondrial DNA.' *The New England journal of medicine*, 347(8) pp. 576–80.

Seidman, J. G. y Seidman, C. (2001) 'The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms.' *Cell*, 104(4) pp. 557–67.

Skladal, D., Halliday, J. y Thorburn, D. R. (2003) 'Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children.' *Brain : a journal of neurology*, 126(Pt 8) pp. 1905–12.

Smeitink, J. A. M., Elpeleg, O., Antonicka, H., Diepstra, H., Saada, A., Smits, P., Sasarman, F., Vriend, G., Jacob-Hirsch, J., Shaag, A., Rechavi, G., Welling, B., Horst, J., Rodenburg, R. J., van den Heuvel, B. y Shoubbridge, E. A. (2006) 'Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs.' *American journal of human genetics*, 79(5) pp. 869–77.

Smeitink, J. A., Zeviani, M., Turnbull, D. M. y Jacobs, H. T. (2006) 'Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders.' *Cell metabolism*, 3(1) pp. 9–13.

Smits, P., Mattijssen, S., Morava, E., van den Brand, M., van den Brandt, F., Wijburg, F., Pruijn, G., Smeitink, J., Nijtmans, L., Rodenburg, R. y van den Heuvel, L. (2010) 'Functional consequences of mitochondrial tRNA Trp and tRNA Arg mutations causing combined OXPHOS defects.' *European journal of human genetics : EJHG*, 18(3) pp. 324–9.

Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G. M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H. T., Zeviani, M. y Larsson, C. (2001) 'Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria.' *Nature genetics*, 28(3) pp. 223–31.

Stalder, N., Yarol, N., Tozzi, P., Rotman, S., Morris, M., Fellmann, F., Schwitter, J. y Hullin, R. (2012) 'Mitochondrial A3243G mutation with manifestation of acute dilated cardiomyopathy.' *Circulation. Heart failure*, 5(1) pp. e1–3.

Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S. y Huang, T. (2010) 'Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome.' *Mitochondrion*, 10(4) pp. 350–7.

Taniike, M., Fukushima, H., Yanagihara, I., Tsukamoto, H., Tanaka, J., Fujimura, H., Nagai, T., Sano, T., Yamaoka, K. y Inui, K. (1992) 'Mitochondrial tRNA(Ile) mutation in fatal cardiomyopathy.' *Biochemical and biophysical research communications*, 186(1) pp. 47–53.

Tanji, K., Kaufmann, P., Naini, A. B., Lu, J., Parsons, T. C., Wang, D., Willey, J. Z., Shanske, S., Hirano, M., Bonilla, E., Khandji, A., Dimauro, S. y Rowland, L. P. (2008) 'A novel tRNA(Val) mitochondrial DNA mutation causing MELAS.' *Journal of the neurological sciences*, 270(1-2) pp. 23–7.

Tavi, P., Hansson, A., Zhang, S.-J., Larsson, N.-G. y Westerblad, H. (2005) 'Abnormal Ca(2+) release and catecholamine-induced arrhythmias in mitochondrial cardiomyopathy.' *Human molecular genetics*, 14(8) pp. 1069–76.

Taylor, R. W., Chinnery, P. F., Haldane, F., Morris, A. A., Bindoff, L. A., Wilson, J. y Turnbull, D. M. (1996) 'MELAS associated with a mutation in the valine transfer RNA gene of mitochondrial DNA.' *Annals of neurology*, 40(3) pp. 459–62.

Taylor, R. W., Giordano, C., Davidson, M. M., D'Amati, G., Bain, H., Hayes, C. M., Leonard, H., Barron, M. J., Casali, C., Santorelli, F. M., Hirano, M., Lightowlers, R. N., DiMauro, S. y Turnbull, D. M. (2003) 'A

homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy.' *Journal of the American College of Cardiology*, 41(10) pp. 1786–96.

Taylor, R. W., McDonnell, M. T., Blakely, E. L., Chinnery, P. F., Taylor, G. A., Howell, N., Zeviani, M., Briem, E., Carrara, F. y Turnbull, D. M. (2003) 'Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution.' *Annals of neurology*, 54(4) pp. 521–4.

Taylor, R. W. y Turnbull, D. M. (2005) 'Mitochondrial DNA mutations in human disease.' *Nature reviews. Genetics*, 6(5) pp. 389–402.

Thebault, C., Ollivier, R., Leurent, G., Marcorelles, P., Langella, B. y Donal, E. (2008) 'Mitochondriopathy: a rare aetiology of restrictive cardiomyopathy.' *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology*, 9(6) pp. 840–5.

Thiene, G., Basso, C., Calabrese, F., Angelini, A. y Valente, M. (2005) 'Twenty years of progress and beckoning frontiers in cardiovascular pathology: cardiomyopathies.' *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 14(4) pp. 165–9.

Tiranti, V., Chariot, P., Carella, F., Toscano, A., Soliveri, P., Girlanda, P., Carrara, F., Fratta, G. M., Reid, F. M., Mariotti, C. y Zeviani, M. (1995) 'Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene.' *Human molecular genetics*, 4(8) pp. 1421–7.

Tiranti, V., D'Agruma, L., Pareyson, D., Mora, M., Carrara, F., Zelante, L., Gasparini, P. y Zeviani, M. (1998) 'A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Val) gene associated with a complex neurological presentation.' *Annals of neurology*, 43(1) pp. 98–101.

Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M. y Taylor, R. W. (2010) 'Mitochondrial DNA mutations and human disease.' *Biochimica et biophysica acta*, 1797(2) pp. 113–28.

Turrens, J. F. (2003) 'Mitochondrial formation of reactive oxygen species.' *The Journal of Physiology*, 552(2) pp. 335–344.

Vahsen, N., Candé, C., Brière, J.-J., Bénit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P. G., Pequignot, M. O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J. M., Schägger, H., Rustin, P. y Kroemer, G. (2004) 'AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation.' *The EMBO journal*, 23(23) pp. 4679–89.

Vedrenne, V., Galmiche, L., Chretien, D., de Lonlay, P., Munnich, A. y Rötig, A. (2012) 'Mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs results in severe infantile liver failure.' *Journal of hepatology*, 56(1) pp. 294–7.

Verhoeven, W. M., Egger, J. I., Kremer, B. P., de Pont, B. J. y Marcelis, C. L. (2011) 'Recurrent major depression, ataxia, and cardiomyopathy: association with a novel POLG mutation?' *Neuropsychiatric disease and treatment*, 7, January, pp. 293–6.

Vives-Bauza, C., Gonzalo, R., Manfredi, G., Garcia-Arumi, E. y Andreu, A. L. (2006) 'Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA.' *Neuroscience letters*, 391(3) pp. 136–41.

Vydt, T. C. G., de Co, R. F. M., Soliman, O. I. I., Ten Cate, F. J., van Geuns, R.-J. M., Vletter, W. B., Schoonderwoerd, K., van den Bosch, B. J. C., Smeets, H. J. M. y Geleijnse, M. L. (2007) 'Cardiac involvement in adults with m.3243A>G MELAS gene mutation.' *The American journal of cardiology*, 99(2) pp. 264–9.

Wallace, D. C. (2005) 'A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine.' *Annual review of genetics*, 39, January, pp. 359–407.

Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J. y Nikoskelainen, E. K. (1988) 'Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy.' *Science (New York, N.Y.)*, 242(4884) pp. 1427–30.

Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Brüning, J. C., Kahn, C. R., Clayton, D. A., Barsh, G. S., Thorén, P. y Larsson, N. G. (1999) 'Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression.' *Nature genetics*, 21(1) pp. 133–7.

Wang, Y. y Bogenhagen, D. F. (2006) 'Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane.' *The Journal of biological chemistry*, 281(35) pp. 25791–802.

Ware, S. M., El-Hassan, N., Kahler, S. G., Zhang, Q., Ma, Y.-W., Miller, E., Wong, B., Spicer, R. L., Craigen, W. J., Kozel, B. A., Grange, D. K. y Wong, L.-J. (2009) 'Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes.' *Journal of medical genetics*, 46(5) pp. 308–14.

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. y Chandel, N. S. (2010) 'Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity.' *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010/04/28 ed., 107(19) pp. 8788–8793.

Wiedemann, N., Frazier, A. E. y Pfanner, N. (2004) 'The protein import machinery of mitochondria.' *The Journal of biological chemistry*, 279(15) pp. 14473–6.

Woischwill, C., Karczewski, P., Bartsch, H., Luther, H.-P., Kott, M., Haase, H. y Morano, I. (2005) 'Regulation of the human atrial myosin light chain 1 promoter by Ca²⁺-calmodulin-dependent signaling pathways.' *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6) pp. 503–11.

Yamauchi-Takahara, K. y Kishimoto, T. (2000) 'Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance.' *International journal of experimental pathology*, 81(1) pp. 1–16.

Yarham, J. W., Al-Dosary, M., Blakely, E. L., Alston, C. L., Taylor, R. W., Elson, J. L. y McFarland, R. (2011) 'A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations.' *Human mutation*, 32(11) pp. 1319–25.

Zeviani, M., Gellera, C., Antozzi, C., Rimoldi, M., Morandi, L., Villani, F., Tiranti, V. y DiDonato, S. (1991) 'Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA(Leu)(UUR).' *Lancet*, 338(8760) pp. 143–7.

Zeviani, M., Mariotti, C., Antozzi, C., Fratta, G. M., Rustin, P. y Prella, A. (1995) 'OXPHOS defects and mitochondrial DNA mutations in cardiomyopathy.' *Muscle & nerve. Supplement*, 3, January, pp. S170–4.

Zeviani, M., Servidei, S., Gellera, C., Bertini, E., DiMauro, S. y DiDonato, S. (1989) 'An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region.' *Nature*, 339(6222) pp. 309–11.

Zeviani, M., Spinazzola, A. y Carelli, V. (2003) 'Nuclear genes in mitochondrial disorders.' *Current opinion in genetics & development*, 13(3) pp. 262–70.

Zhang, D., Ezekiel, U. R., Chang, S.-W. y Zassenhaus, H. P. (2005) 'Gene expression profile in dilated cardiomyopathy caused by elevated frequencies of mitochondrial DNA mutations in the mouse heart.' *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 14(2) pp. 61–9.

Zhang, J., Klos, M., Wilson, G. F., Herman, A. M., Lian, X., Raval, K. K., Barron, M. R., Hou, L., Soerens, A. G., Yu, J., Palecek, S. P., Lyons, G. E., Thomson, J. A., Herron, T. J., Jalife, J. y Kamp, T. J. (2012) 'Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method.' *Circulation research*, 111(9) pp. 1125–36.

Anexos

Video 1. Secuencia de imágenes tomada con un Cell Observer (Zeiss) de las áreas contráctiles de un cuerpo embrioide, adherido a una placa tratada con gelatina. Se utilizó el objetivo 10X.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

Villar, P., Bretón, B., García-Pavía, P., González-Páramos, C., Blázquez, A., Gómez-Bueno, M., García-Silva, T., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Garesse, R., Bornstein, B. y Gallardo, M. E. (2013) 'Cardiac dysfunction in mitochondrial disease. Clinical and molecular features.' *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 77(11) pp. 2799–806.

Además, el doctorando ha participado en el trabajo recogido en la siguiente publicación:

Guerrero, L., Villar, P., Martínez, L., Badia-Careaga, C., Arredondo, J. J., Cervera, M., (2014) 'In vivo cell tracking of mouse embryonic myoblasts and fast fibers during development.' *Genesis*, 52(9) pp. 793–808.

